



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΧΟΥΜΕΡΙΑΝΟΥ

Διδακτορική Διατριβή

**"Ανάλυση γενετικού υπόβαθρου σε ασθενείς με οικογενή
υπερχοληστερολαιμία. Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου."**

Απρίλιος 2006

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Δεδούσης, Επίκουρος Καθηγητής “Βιολογίας”, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νικόλαος Ανδρικόπουλος, Καθηγητής “Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων”, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Εμμανουήλ Καναβάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής “Ιατρικής Γενετικής”, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Φωτεινή Σκοπούλη, Καθηγήτρια “Παθολογίας-Ανοσολογίας”, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Βασίλειος Σταυρινός, Καθηγητής “Ποσοτικής Ανάλυσης Οικονομικών και Κοινωνικών Φαινομένων”, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια “Βιοχημείας”, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Χρήστος Πίτσαβος, Αναπληρωτής Καθηγητής “Καρδιολογίας”, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Στους γονείς μου...

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	i
Συντμήσεις	iv
Ευχαριστίες	vi
Περίληψη	viii
Summary	x

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Η στεφανιαία νόσος-Μια πολυπαραγοντική νόσος	2
1.2 Η μοριακή γενετική στην καρδιαγγειακή νόσο	3
1.3 Κανονισμοί για την εφαρμογή γενετικής ανάλυσης	4
1.4 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Familial Hypercholesterolemia-FH)	6
1.5 Το σύστημα μεταφοράς λιπιδίων και ο μεταβολισμός της χοληστερόλης	9
1.5.1 Λιπίδια του πλάσματος	9
1.5.2 Λιποπρωτεΐνες και απολιποπρωτεΐνες	9
1.5.3 Ρύθμιση της HMG-CoA αναγωγάσης από την LDL σε ινοβλάστες	10
1.5.4 Το σύστημα μεταφοράς της χοληστερόλης	11
1.6 Αθηροσκλήρυνση	13
1.7 Ο LDL-R	15
1.7.1 Δομή του LDL-R	15
1.7.2 Το γονίδιο του LDLR	17
1.7.3 Μεταλλάξεις στο γονίδιο του LDLR	19
1.7.4 Η έκφραση του LDL-R in vivo	21
1.8 Έλλειψη υποδοχέων LDL-R	22
1.9 Διάγνωση της FH	22
1.9.1 Βιοχημική διάγνωση	22
1.9.2 Κλινική διάγνωση	23
1.9.3 Γενετική διάγνωση	25
1.10 Μέθοδοι γενετικής ανάλυσης	26
1.11 Θεραπεία για την FH	27

1.11.1	Διαιτητική αγωγή	27
1.11.2	Φαρμακευτική αγωγή	29
1.11.3	Άλλες θεραπευτικές επιλογές	32
1.12	Άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της CAD	33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ		37
2.1	Διάγνωση FH	38
2.2	Αναλύσεις αίματος (γενικές, βιοχημικές).	38
2.3	Εφαρμογή θεραπείας	39
2.4	Ασθενείς	39
2.5	Γενετική ανάλυση	40
	2.5.1 Απομόνωση DNA	40
	2.5.2 PCR για ανάλυση με DGGE	41
	2.5.3 DGGE	43
	2.5.4 Ανάγνωση πρωτοδιάταξης DNA-Sequencing	47
	2.5.5 Γρήγορη ανίχνευση μεταλλάξεων	50
	2.5.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	52
	2.5.7 Long PCR	53
	2.5.8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Long PCR σε πήκτωμα αгарόζης	55
	2.5.9 Πολλαπλή PCR για την ανάλυση πολυμορφισμών (Multiplex PCR)	56
2.6	Μέτρηση της έκφρασης και της λειτουργικότητας του LDL-R	58
	2.6.1 Απομόνωση mRNA από ασθενή με μετάλλαξη -45delT	58
	2.6.2 Αντίστροφης μεταγραφής PCR (Reverse Transcription PCR-RT-PCR)	58
	2.6.3 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA	59
	2.6.4 Μέτρηση της έκφρασης του LDL-R με δοκιμή πρόσδεσης σε ιωδιωμένη LDL	59
	2.6.5 Επιμόλυνση	60
2.7	Γεωγραφική κατανομή μεταλλάξεων	62
2.3	Ονοματολογία μεταλλάξεων (Nomenclature)	62
2.9	Υπολογισμός συχνότητας αλληλομόρφων	62
2.10	Στατιστική επεξεργασία	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		65
3.1	Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με FH	66
3.2	Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης για τα γονίδια <i>LDLR</i> και <i>ApoB</i>	66
3.3	Οι μεταλλάξεις του <i>LDLR</i> στον Ελληνικό πληθυσμό και η γεωγραφική κατανομή τους	72
3.4	Μελέτη της νέας μετάλλαξης -45delT	76
	3.4.1 Γενετική ανάλυση και οικογενειακό ιστορικό	76
	3.4.2 Η μετάλλαξη -45delT επηρεάζει την έκφραση και τη λειτουργικότητα του <i>LDL-R</i>	78
3.5	Ο τύπος της μετάλλαξης στον <i>LDLR</i> επηρεάζει τον φαινότυπο της FH	81
3.6	Ο γονότυπος της <i>ApoE</i> δεν επηρεάζει τον φαινότυπο της FH	84
3.7	Πολυμορφισμοί σε 5 γονίδια επηρεάζουν τα επίπεδα της Apo-B	87
3.8	Πολυμορφισμός στο γονίδιο ANP επηρεάζει τα επίπεδα της Apo-AI και της HDL-C αλλά όχι τη συχνότητα εμφάνισης CAD	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ		63
4.1	Φάσμα <i>LDLR</i> μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό	97
4.2	Επίδραση των μεταλλάξεων του <i>LDLR</i> στο φαινότυπο της FH	103
4.3	Άλλοι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον φαινότυπο της FH	110
4.4	Συμπεράσματα	117
4.5	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα και εφαρμογές	118
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		121
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		160
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ		167

Συντμήσεις

DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
ACAT	Cholesterol Acyltransferase	Ακυλοτρανσφεράση χοληστερόλης
ADH	Autosomal Dominant Hypercholesterolemia	Αυτοσωμική επικρατής υπερχοληστερολαιμία
ANP	Atrial Natriuretic Peptide	Κολπικό νατριδιουρητικό πεπτίδιο
APO	Apolipoprotein	Απολιποπρωτεΐνη
ASO	Allele Specific Oligonucleotide	Ολιγονουκλεοτίδια συγκεκριμένων αλληλομόρφων
ATP III	Adult Treatment Panel III	Πλαίσιο Θεραπείας Ενηλίκων III
AREs	AU Rich Elements	Πλούσια σε AU στοιχεία
bp	base pairs	Ζεύγη βάσεων
CAD	Coronary Artery Disease	Στεφανιαία νόσος
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein	Πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης
CU	Conventional Units	Συμβατικές μονάδες
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση κλίσης αποδιατακτικών παραγόντων
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography	Υψηλής επίδοσης υγρή χρωματογραφία αποδιάταξης
EGF	Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FDB	Familial Defective Apolipoprotein B	Ελαττωματική απολιποπρωτεΐναιμία B
FGB	Fibrinogen B	Ινωδογόνο B
FH	Familial Hypercholesterolemia	Οικογενής Υπερχοληστερολαιμία
HDL	High Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HMG Co-A	3-hydroxy 3-methylglutaryl Co-A	3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλο-CoA αναγωγή
IDL	Intermediate Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη ενδιάμεσης πυκνότητας
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
Kb	Kilobase pair	Χιλιάδα ζευγών βάσεων
KDa	Kilodaltons	Χιλιάδα dalton
LDL	Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LDL-R	Low Density Lipoprotein Receptor	Υποδοχέας λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας
LPL	Lipoprotein Lipase	Λιποπρωτεϊνική λιπάση
MEDPED	Make Early Diagnosis to Prevent Early Death	Πρόωση Διάγνωση για την πρόληψη πρώρου θανάτου

MLPA	Multiple Ligation Dependent Probe Assay	Δοκιμή σύνδεσης πολλαπλών ανιχνευτών
NARK-1	Neural Apoptosis Regulated Convertase 1	Νευρική αποπτωτική ρυθμιζόμενη κονβερτάση 1
NCEP	National Cholesterol Education Program	Εθνικό πρόγραμμα εκπαίδευσης για τη χοληστερόλη
NOS	Nitric Oxide Synthase	Συνθετάση μονοξειδίου του αζώτου
OLA	Oligonucleotide Ligation Assay	Δοκιμή πρόσδεσης ολιγονουκλεοτιδίων
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor	Αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PON	Paraoxonase	Παραοξονάση
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλικό οξύ
RT-PCR	Reverse Transcription PCR	Αντίστροφης μεταγραφής PCR
ROS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές μορφές οξυγόνου
SI	Standard International Units	Διεθνείς μονάδες
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου
SRE	Sterol Regulatory Element	Στοιχείο ρύθμισης στερόλης
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism	Ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης του ενός κλώνου
TLC	Therapeutic Lifestyle Changes	Θεραπευτικές αλλαγές τρόπου ζωής
<i>TNF</i>	Tumor Necrosis Factor	Ογκονεκρωτικός παράγοντας
TG	Triglycerides	Τριγλυκερίδια
UTR	Untranslated Region	Μη μεταφραζόμενη περιοχή
VLDL	Very Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας
WHO	World Health Organisation	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών, του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής κύριο Γεώργιο Δεδούση, Επίκουρο Καθηγητή “Βιολογίας”, για την παρότρυνση στην πραγματοποίηση αυτής της διδακτορικής διατριβής, την επιστημονική υποστήριξη κατά τη διάρκεια της έρευνας αλλά και τις συμβουλές του για διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής κυρίους Νικόλαο Ανδρικόπουλο, Καθηγητή “Βιοχημείας-Χημείας Τροφίμων” και Εμμανουήλ Καναβάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή “Ιατρικής Γενετικής”, για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη διόρθωση της διατριβής μου.

Για το χρόνο που αφιέρωσαν συμμετέχοντας στη Επταμελή Επιτροπή ευχαριστώ την Κυρία Φωτεινή Σκοπούλη, Καθηγήτρια, τον Κύριο Βασίλειο Σταυρινό, Καθηγητή και την Κυρία Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να ευχαριστήσω τους καρδιολόγους της Α' Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής Αθήνας, κυρίους Χρήστο Πίτσαβο, Αναπληρωτή Καθηγητή και μέλος της Επταμελούς Επιτροπής, και Γιάννη Σκούμα, Επιμελητή Α'. Χωρίς τη συμβολή τους στη διάγνωση των ασθενών που συμμετείχαν στην έρευνα, η πραγματοποίηση της διατριβής δεν θα ήταν εφικτή. Ευχαριστώ επίσης, τον Διαιτολόγο-Διατροφολόγο της Μονάδας Λιπιδίων του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Μανόλη Κάμπαξη, για τη βοήθεια στη συλλογή των σωματομετρικών και των κλινικών στοιχείων των συμμετεχόντων. Μεγάλης σημασίας ήταν η βοήθεια του Καθηγητή Γαστρεντερολογίας-Ηπατολογίας Hartmut Schmidt και της Dr Janine Buttner στο νοσοκομείο Charité του Βερολίνου όπου έγιναν οι αναλύσεις της πρωτοδιάταξης του DNA, και Dr Sophie Visvikis Siest και Sandy Maumus, στο Ινστιτούτο INSERM στο Nancy της Γαλλίας, όπου έγινε μέρος της ανάλυσης των πολυμορφισμών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζουν στις φίλες μου και “συνοδοιπόρους” σε αυτή τη διαδρομή Ειρήνη Λουΐζου και Ειρήνη Θεοδωράκη για τη συνεχή συμπαράσταση και τις συζητήσεις επιστημονικού ενδιαφέροντος.

Ευχαριστώ τον Χρήστο για την αγάπη, την υποστήριξη και τη συμπαράσταση καθώς και για τις ιδιαίτερα σημαντικές επιστημονικές συμβουλές του κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τα αδέρφια μου Αλέξανδρο και Μιλτιάδη που αν και μακριά, ο πρώτος με την αγάπη και την ωριμότητα του με στήριξε σε πολλές δύσκολες στιγμές ενώ ο δεύτερος μου προσέφερε το πιο ειλικρινές χαμόγελο κάνοντας με να συνεχίζω με αισιοδοξία.

Για τους γονείς μου Στέλλα και Μίλτο, κρατώ το μεγαλύτερο ευχαριστώ για την αγάπη χωρίς ανταλλάγματα που μου δείχνουν κάθε μέρα, ιδιαίτερα όλα αυτά τα χρόνια που είμαι μακριά τους. Τους ευχαριστώ για την κατανόηση και την υπομονή τους αλλά και την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν και μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω όλες μου τις σπουδές. Όσα κι αν πω κι αν κατορθώσω δεν είναι αρκετά για να τους δείξω πόσο τυχερή είμαι που τους έχω και σίγουρα δεν θα ανταποδώσουν όλα αυτά που μου έχουν προσφέρει.

Περίληψη

Η οικογενής υπερχοληστερολαιμία είναι αυτοσωμική επικρατής νόσος που προσβάλλει 1 στα 500 άτομα. Η ασθένεια αυτή οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein Receptor-*LDLR*). Χαρακτηρίζεται κυρίως από υψηλά επίπεδα ολικής χοληστερόλης ορού και LDL χοληστερόλη μεγαλύτερη από 200mg/dL. Η μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα λιπιδίων και στην συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου αποδίδεται όχι μόνο στον τύπο της μετάλλαξης στον *LDLR*, αλλά και στην έκφραση άλλων ρυθμιστικών γονιδίων καθώς επίσης και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η διατροφή και η φυσική δραστηριότητα.

Στόχοι της διατριβής ήταν (α) η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο του *LDLR* (αριθμός, είδος, συχνότητα) σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία, (β) η κατανομή των μεταλλάξεων στην Ελλάδα, (γ) η συσχέτισή τους με την κλινική εικόνα της νόσου (δ) η ανάλυση γνωστών πολυμορφισμών σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην εξέλιξη της στεφανιαίας νόσου και στο μεταβολισμό των λιπιδίων και η συσχέτισή τους με τον φαινότυπο.

Για την ανάλυση των μεταλλάξεων εφαρμόστηκε η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε κλίση αποδιατακτικών παραγόντων (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis-DGGE) ανάγνωση της πρωτοδιάταξης του DNA. Ταυτοποιήσαμε 17 μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR* σε 67 ασθενείς και 11 συγγενείς του. Οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στον υποκινητή και σε οκτώ εξόνια (2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, και 14) του *LDLR*.

Έντεκα από τις μεταλλάξεις είναι παρερμηνεύσιμες, δύο είναι ανερμηνεύσιμες, τρεις βρίσκονται στα όρια μεταξύ εσονίου και εξονίου (splice site) και μία οφείλεται σε έλλειψη ενός νουκλεοτιδίου στον υποκινητή του *LDLR* (-45delT). Μεταξύ αυτών οι V408M, G528D, C6W και S265R, βρέθηκαν σε ποσοστό 73% στους ασθενείς που ήταν φορείς μεταλλάξεων. Η μετάλλαξη V408M παρατηρήθηκε με μεγάλη συχνότητα στην κεντρική Δυτική Ελλάδα ενώ η C6W είναι πιο συχνή στην κεντρική Ανατολική Ελλάδα. Οι μεταλλάξεις A410T, A519T, 1706-10 G>A και 2140+9 C>T, βρέθηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα και η -45delT αναφέρθηκε για πρώτη φορά στον κόσμο. Πειράματα έκφρασης για τη μελέτη της πρωτοαναφερόμενης μετάλλαξης -del45T έδειξαν μείωση της έκφρασης του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου στο 5% με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας πρόσδεσης του LDL-R στην LDL κατά 76%.

Χωρίζοντας τους ασθενείς σε φορείς μετάλλαξης ελαττωματικού υποδοχέα

και φορείς μετάλλαξης αρνητικού υποδοχέα, παρατηρήθηκε ότι οι φορείς μετάλλαξης αρνητικού υποδοχέα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης, και έξι φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων.

Η ύπαρξη του αλληλομόρφου E4 για τον γονότυπο της *ApoE* δεν συνδέεται με τα επίπεδα λιπιδίων αλλά ούτε και με τη συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Άλλοι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν είναι οι PON 2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A, NOS A-922G και ANP T2238C και G644A. Για τον πολυμορφισμό PON 2 Ser311Cys, οι φορείς του αλληλομόρφου Cys παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ολικής και LDL χοληστερόλης και Apo-B. Υψηλότερα επίπεδα Apo-B παρουσίασαν επίσης οι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο Asn στη θέση 291 της LPL, οι φορείς του αλληλομόρφου T στη θέση 11053 του γονιδίου PAI, οι φορείς του G αλληλομόρφου στη θέση -455 του γονιδίου FGB και οι φορείς του αλληλομόρφου A για τον πολυμορφισμό NOS A-922G. Από τους πολυμορφισμούς G644A και C2238T στο γονίδιο ANP το αλληλόμορφο A στη θέση 644 συνδέεται με χαμηλότερα επίπεδα Apo-A και HDL-C.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο Ελληνικός πληθυσμός είναι αρκετά ομοιογενής σε σύγκριση με άλλους, ως προς τις μεταλλάξεις στον *LDLR*. Ο τύπος της μετάλλαξης του *LDLR* επηρεάζει τον φαινότυπο της οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας ενώ στην διαμόρφωση λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών φαίνεται να εμπλέκονται και άλλα γονίδια.

Summary

Familial hypercholesterolemia is an autosomal dominant disease with a prevalence of 1:500. The disease is mainly caused by mutations in the low density lipoprotein receptor gene (*LDLR*). It is characterised mainly by high serum total cholesterol levels and LDL-C above 200mg/dL. The great variability in lipid levels and the prevalence of coronary artery disease may not be solely explained by the type of *LDLR* mutation. Other factors such as the environment and modifying genes have been found to affect the phenotype of the disease.

The aims of the study were (a) to identify mutations in *LDLR* gene (number, type, frequency) in familial hypercholesterolemia patients, (b) to find out their distribution in Greece, (c) to correlate the mutations with the phenotype and (d) to analyse genes involved in the development of coronary artery disease and lipid metabolism for common polymorphisms and correlate them with the phenotype.

Using DGGE and DNA sequencing analysis, we found 17 mutations were found on the *LDLR* gene in 67 probands and 11 relatives. Mutations were located in the promoter and 8 different exons (2, 5, 6, 8, 9, 11, 12 and 14) of the *LDLR*. Among them 11 were missense mutations, two were nonsense mutations, 3 were splice defects (2140+5G>A and 2140+9C>T, 1706-10 G>A) and 1 one was a nucleotide substitution (-45delT) on the promoter. The mutations V408M, G528D, C6W and S265R, account for 73% of heterozygous familial hypercholesterolemia probands. V408M mutation is more common in Central West, while C6W is more common in Central East. From the above mutations A410T, A519T, and the splice site defects 2140+9 C>T are detected for the first time in the Greek population and -45delT is mentioned for the first time worldwide. Expression studies for the newly reported -45delT mutation revealed that the patient bearing the mutated allele had reduced expression to 5% of normal which resulted in reduction of LDL-R binding properties by 76%.

Dividing the patients into two groups, receptor defective and receptor negative carriers it was shown that receptor negative carriers have higher total and LDL cholesterol levels, and 6-fold higher incidence of xanthomas.

Apart from the genetic analysis performed in *LDLR* and *ApoB* genes, analysis in genes known to be involved in biochemical pathways implicated in the progression and the development of cardiovascular disease.

The presence of the E4 allele for the *ApoE* genotype is not associated with lipid levels or the incidence of coronary disease in familial hypercholesterolemia. Other

polymorphisms investigated are PON 2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A, NOS A-922G and ANP T2238C and G644A. The PON2 Cys311 allele was correlated with high total and LDL cholesterol and apolipoprotein B levels, while LPL Asn291, PAI-1 T11053, FGB G-455 and NOS A-922 allele were correlated with high apolipoprotein B levels. Only the A allele of the ANP G644A was associated with lower levels of Apo-A and HDL-C.

These results suggest the Greek population is very homogenous regarding the *LDLR* mutations compared to others. The type of *LDLR* mutation affects the clinical phenotype of familial hypercholesterolemia and other genes seem to be involved in the determination of the lipid profile of patients.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η στεφανιαία νόσος- Μια πολυπαραγοντική νόσος

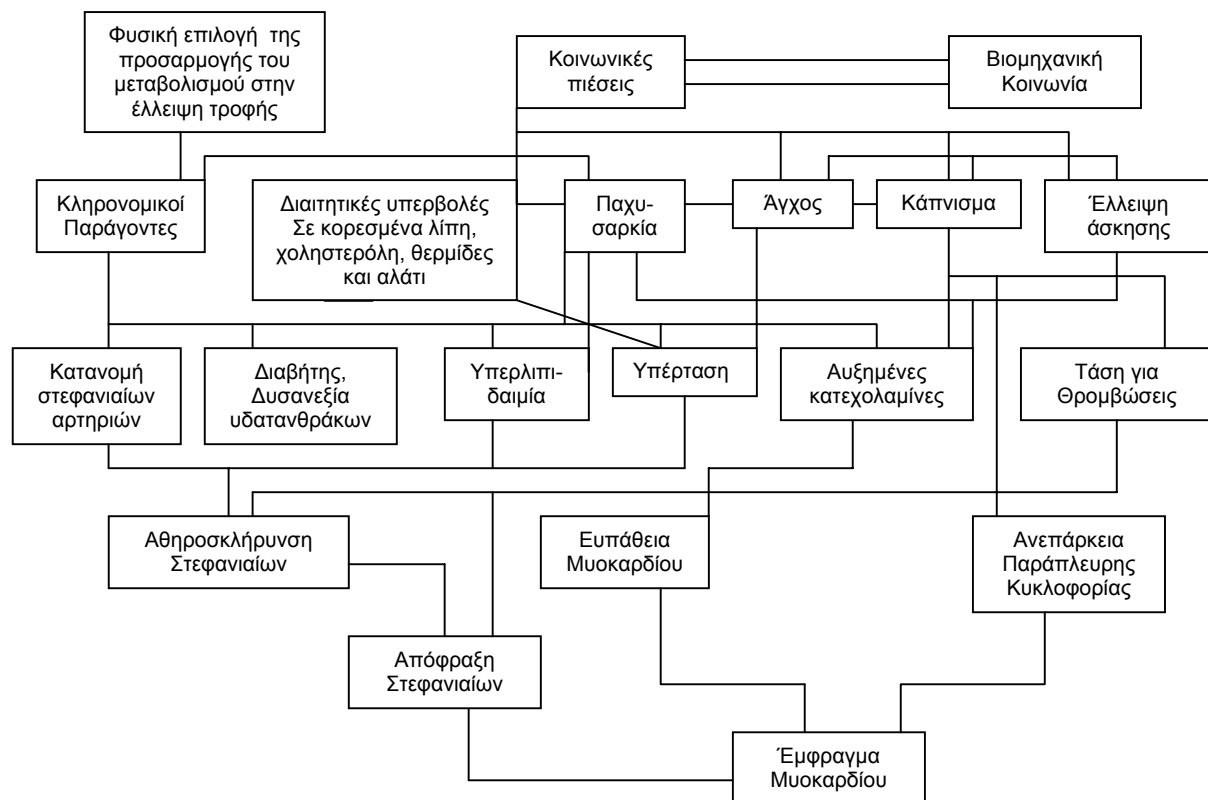
Τα νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος που προκαλούνται από την αθηροσκλήρυνση είναι υπεύθυνα για το 50% των θανάτων στις αναπτυγμένες χώρες. Από τις παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος η στεφανιαία νόσος (coronary artery disease-CAD) αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου. Μεταξύ ενός και 24 ετών, λιγότερο από 1% των θανάτων οφείλονται στην CAD ενώ από την ηλικία των 55 έως 84 ετών οι θάνατοι λόγω CAD μπορεί να φτάσουν το 50% (Wilcken, 2003).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες με αντικείμενο την αιτιολογία της CAD αποδεικνύοντας ότι πολλοί παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με το σύγχρονο τρόπο ζωής. Τέτοιοι παράγοντες είναι η διατροφή, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η έλλειψη φυσικής άσκησης, το ψυχοκοινωνικό άγχος, η κατάθλιψη και το χαμηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο των ανθρώπων. Με βάση τις μελέτες αυτές έχουν αναπτυχθεί στοχαστικά μοντέλα που εκτιμούν τον απόλυτο ή το σχετικό κίνδυνο εκδήλωσης στεφανιαίων συνδρόμων (Πίτσαβος και συν., 2004). Στην **Εικόνα 1.1** παρουσιάζεται η αιτιολογική σύνδεση των διαφόρων παραγόντων κινδύνου για την εκδήλωση οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

Η ραγδαία εξέλιξη στην αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος είχε ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της έρευνας για το ρόλο πολυμορφισμών και μεταλλάξεων στην παθογένεση πολύπλοκων πολυπαραγοντικών ασθενειών. Η ξεχωριστή ιδιότητα των πολυπαραγοντικών ασθενειών είναι η απουσία ενός αίτιου όπως μια μόλυνση, ή μια μετάλλαξη σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Πολύπλοκες αντιδράσεις μεταξύ ενδογενών και εξωγενών παραγόντων ορίζουν την πιθανότητα ανάπτυξης μιας πολυπαραγοντικής ασθένειας.

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν διερευνήσει την αιτιολογία της CAD αναδεικνύοντας παράγοντες κινδύνου όπως τα υψηλά επίπεδα LDL και τα χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (High Density Lipoprotein- HDL). Επιπλέον, σε πολλές σημαντικές κλινικές μελέτες φαίνεται η σημασία της μείωσης της LDL χοληστερόλης (LDL-C) και ο προστατευτικός ρόλος της HDL χοληστερόλης (HDL-C) για την πρόληψη της CAD και της θνησιμότητας που προκαλεί.

Αν και έχει συγκεντρωθεί ένας μεγάλος όγκος επιστημονικών στοιχείων, οι παρεμβάσεις για την πρόληψη της CAD δεν έχουν συμβάλει όσο θα αναμέναμε στην αποτελεσματική μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων (Loktionov, 2003, Πίτσαβος και συν., 2004). Αυτό συμβαίνει γιατί η CAD οφείλεται τόσο σε περιβαλλοντικούς όσο και σε γενετικούς παράγοντες και αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο.



Εικόνα 1.1. Ιστός αιτιολογικών παραγόντων της στεφανιαίας νόσου (Πηγή Alhborn et al., 1992).

1.2 Η μοριακή γενετική στην CAD

Η μοριακή καρδιολογία αποτελεί ένα νέο τρόπο προσέγγισης της ανάπτυξης της CAD, της εξέλιξης και της παθοφυσιολογίας της. Υπολογίζεται ότι πάνω από 400 γονίδια εμπλέκονται στην ρύθμιση της ενδοθηλιακής λειτουργίας, στην πήξη, στη φλεγμονή και στον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων. Από τα παραπάνω ο μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών είναι αυτός που έχει μελετηθεί περισσότερο (Dovendans et al., 2001). Έχουν βρεθεί πολλά γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και πολλά από αυτά έχουν συσχετιστεί με την αθηροσκλήρυνση και την CAD.

Η προσέγγιση μέσω της μοριακής γενετικής βασίζεται στην συσχέτιση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών με μία συγκεκριμένη λειτουργία. Αρκετές τεχνικές της μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γενετικών διαφορών μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Οι όροι “πολυμορφισμός” και “μετάλλαξη” δηλώνουν τη γενετική ποικιλομορφία. Εάν η συχνότητα της ποικιλομορφίας είναι πάνω από 1% στο γενικό πληθυσμό τότε ορίζεται ως πολυμορφισμός. Όταν η συχνότητα είναι μικρότερη και έχει δείχθει ότι η συγκεκριμένη αλλαγή στο DNA είναι το αίτιο της

νόσου τότε ορίζεται ως μετάλλαξη.

Υπολογίζεται ότι σε κάθε 1000 ζεύγη βάσεων (base pairs-bp) στο DNA εμφανίζονται πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism-SNP). Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί βρίσκονται σε μη κωδικές θέσεις (non-coding regions) οι οποίες αποτελούν το 90% του συνολικού DNA. Έτσι η μειονότητα των πολυμορφισμών βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία κωδικών θέσεων (Strachan et al., 2000). Για τις πολυπαραγοντικές ασθένειες όπως είναι η CAD η εφαρμογή ενός γενετικού τεστ αφενός δεν είναι εύκολη λύση και αφετέρου δεν δίνει μια σαφή απάντηση για τον κίνδυνο εμφάνισης της ασθένειας. Αντίθετα, η εφαρμογή ενός γενετικού τεστ σε μονογενείς ασθένειες όπως είναι η οικογενής υπερχοληστερολαιμία, δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια που συνδέονται με τη νόσο, συμβάλλοντας στη διάγνωση της ασθένειας.

1.3 Κανονισμοί για την εφαρμογή γενετικής ανάλυσης

Το 1975 ορίστηκε ως γενετική εξέταση (screening) η εύρεση ατόμων στον πληθυσμό που έφεραν συγκεκριμένους γονότυπους που (1) ήδη έχουν προκαλέσει ή προδιαθέτουν για μια ασθένεια, (2) μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια στους απογόνους των ατόμων ή (3) μπορούν να προκαλέσουν άλλα προβλήματα που δεν σχετίζονται άμεσα με την ασθένεια (Committee for the study of Inborn Errors of Metabolism, 1975). Σήμερα με τον όρο γενετική εξέταση εννοούμε την εφαρμογή οποιουδήποτε τεστ με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση ή τον αποκλεισμό κληρονομικών ασθενειών ή τον ορισμό της προδιάθεσης ενός ατόμου και την πιθανότητα μετάδοσής της στους απογόνους του. Η γενετική εξέταση διαφέρει από την γενετική διάγνωση καθώς η διάγνωση πραγματοποιείται σε ασθενείς που ήδη νοσούν και για κάποιους λόγους επιθυμούν την επιβεβαίωση και τις συμβουλές ειδικών. Και στις δύο περιπτώσεις δεν σημαίνει ότι έχοντας το αποτέλεσμα μπορεί να προληφθεί η εμφάνιση της ασθένειας ή να εφαρμοστεί θεραπεία.

Για κάθε πρόγραμμα γενετικής εξέτασης πρέπει να τηρούνται κανονισμοί που να αφορούν τον σκοπό της εφαρμογής, τους ηθικούς περιορισμούς, την αποθήκευση και διαχείριση των δεδομένων και των βιολογικών υλικών, την ανάγκη συνεχιζόμενης παρακολούθησης, και τις παρενέργειες. Οι κύριοι στόχοι ενός τέτοιου προγράμματος είναι η μείωση της εμφάνισης της ασθένειας και η συμβουλευτική σε ζευγάρια για τον κίνδυνο και τις επιλογές στην εγκυμοσύνη.

Το 1968 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organisation-WHO) έθεσε 10 κανονισμούς που πρέπει να τηρούνται για την εφαρμογή οποιασδήποτε εξέτασης (Παράρτημα 1). Οι κανονισμοί αυτοί δόθηκαν το 1968, που δεν είχε

ξεκινήσει η εφαρμογή προγεννητικού ελέγχου και δεν υπήρχε η δυνατότητα εύρεσης απλών φορέων, γι' αυτό αφορούν συγκεκριμένες εξετάσεις (Wilson and Jungner, 1968). Το 1998 ο WHO επαναπροσδιόρισε τον κύριο στόχο της γενετικής εξέτασης που είναι η πρόληψη της ασθένειας ή η εξασφάλιση της έγκαιρης διάγνωσης και θεραπείας. Οι νέοι κανονισμοί είναι οι παρακάτω:

- Η συμμετοχή σε γενετική εξέταση είναι εθελοντική και όχι υποχρεωτική.
- Η γενετική εξέταση πρέπει να ακολουθείται από επαρκή πληροφόρηση για το αίτιο και τα αποτελέσματα της καθώς και τις διαθέσιμες επιλογές μετά την ολοκλήρωσή της.
- Ανώνυμη γενετική εξέταση για επιδημιολογικούς λόγους μπορεί να εφαρμοστεί σε πληθυσμό μετά από την ενημέρωσή του.
- Τα αποτελέσματα δεν επιτρέπεται να είναι διαθέσιμα σε εργοδότες, ασφαλιστικές εταιρίες, ή τρίτα πρόσωπα χωρίς ενυπόγραφη συγκατάθεση του εξεταζόμενου.
- Σε σπάνιες περιπτώσεις, όπου η αποκάλυψη του αποτελέσματος είναι για το συμφέρον του εξεταζόμενου ή της δημόσιας υγείας, ο σύμβουλος μπορεί να προβεί σε αποφάσεις μετά από συζήτηση με τον εξεταζόμενο.
- Η εξέταση πρέπει να ακολουθείται από συμβουλευτική.
- Εάν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία, πρέπει να χορηγείται με την ελάχιστη καθυστέρηση.
- Η εξέταση νεογνών πρέπει να είναι υποχρεωτική και δωρεάν, εφόσον η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία θα ωφελήσει το νεογνό.

Το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο έθεσε κάποιους κανονισμούς μεταξύ 1990-1995, σύμφωνα με τους οποίους “επειδή υπάρχουν διαφορετικές ανάγκες στην υγεία, τις ιατρικές παροχές, τις ηθικές αξίες, αλλά και τη νομοθεσία από χώρα σε χώρα” η απόφαση εφαρμογής γενετικής εξέτασης πρέπει να γίνεται σε συνεργασία με την ιατρική κοινότητα κάθε χώρας. Το 1997 το Συνέδριο για την Προστασία των Ανθρωπίνων Δικαιωμάτων και της Αξιοπρέπειας της Ανθρώπινης Οντότητας σε σχέση με την Εφαρμογή της Βιολογίας και της Ιατρικής (Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with Regard to the Application of Biology and Medicine) επικύρωσε αυτούς τους όρους. Η Επιτροπή Υπουργών του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου (Committee of Ministers of European Council) θεωρεί ότι το κοινό αναγνωρίζει το όφελος της γενετικής εξέτασης σε άτομα και οικογένειες, συχνά όμως η εφαρμογή της ακολουθείται από άγχος. Για το λόγο αυτό το κοινό πρέπει να ενημερώνεται πλήρως πριν την εφαρμογή του προγράμματος.

1.4 Οικογενής υπερχοληστερολαιμία (Familial Hypercholesterolemia-FH)

Η FH είναι η πιο συχνή μορφή γενετικής διαταραχής γνωστής ως επικρατούσα υπερχοληστερολαιμία τύπου IIa και σε αυτήν αποδίδεται το 15% των καρδιακών προσβολών. Η FH περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Carl Møller στη Νορβηγία ως ενδογενές νόσημα του μεταβολισμού. Χαρακτηριστικά της νόσου ήταν τα πολύ υψηλά επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα και η εμφάνιση CAD σε μικρή ηλικία. Ο Møller κατέληξε ότι η FH κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Κατά τις δεκαετίες του 1960 και 1970 ο Khachadurian από το Beirut School of Medicine στο Λίβανο, και οι Fredrickson και Levy από το National Heart and Lung Institute, έδειξαν ότι η FH εμφανίζει δύο κλινικές μορφές: την ελαφριά ή ετερόζυγη και την πιο σοβαρή ή ομόζυγη (Khachadurian, 1964). Η ασθένεια αυτή οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR* (Goldstein and Brown, 1982).

Στους Καυκάσιους, οι ετεροζυγώτες εμφανίζονται με συχνότητα 1:500 (0.2%) (Goldstein et al., 1973b). Η συχνότητα αυτή προκύπτει από τη μελέτη ασθενών με FH στην Αμερική, οι οποίοι επιβίωσαν μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η ίδια συχνότητα αναφέρεται και από μια μελέτη στην Μεγάλη Βρετανία η οποία επίσης πραγματοποιήθηκε σε άτομα που επιβίωσαν μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (Patterson et al., 1972). Επιπλέον, από μια μελέτη όπου βρέθηκε η συχνότητα των ομοζυγών, με την εξίσωση Hardy-Weinberg υπολογίστηκε η συχνότητα των ετεροζυγών (Slack, 1979). Παρόμοια συχνότητα για την FH έχει βρεθεί και σε 4 άλλες χώρες: 0.11% στην Ιαπωνία (Mabuchi et al., 1977), 0.22% στη Νορβηγία (Heiberg et al., 1976), 0.11% στην Δανία (Andersen et al., 1979) και 0.19% στην Ουγγαρία (Kalina et al., 2001). Με εξαίρεση τη μελέτη που αφορά τη Δανία, στις υπόλοιπες υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης της νόσου στον πληθυσμό και όχι η συχνότητα των προσβεβλημένων γεννήσεων. Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι υπάρχουν 20,000 ασθενείς με FH. Σε πολλούς πληθυσμούς η συχνότητα είναι υψηλότερη από 1/500 λόγω του “αποτελέσματος της αρχής του ιδρυτή” (founder effect). Κάτι τέτοιο συμβαίνει όταν ένα μικρό υποσύνολο του πληθυσμού απομονώνεται φυσικά ή και κοινωνικά από τον υπόλοιπο πληθυσμό δημιουργώντας μια γενετικά απομονωμένη κοινωνία. Τα ιδρυτικά μέλη μιας τέτοιας κοινωνίας μπορεί να είναι φορείς μεταλλάξεων οπότε η συχνότητα των αντίστοιχων αλληλομόρφων είναι υψηλότερη απ’ ότι στο γενικό πληθυσμό. Φαινόμενα σαν κι αυτό παρατηρούνται στους Γάλλο-Καναδούς (Moorjani et al., 1989), στους Νότιο-Αφρικανούς (Seftel et al., 1980), στους Τυνήσιους (Slimane et al., 1993), στους Ισλανδούς (Gudnason et al., 1997) και στους Φιλανδούς (Vuorio et al., 2001) και η συχνότητα ποικίλλει από 1/411 (0,24%) στους Φιλανδούς (Vuorio et al., 1997) έως 1/67 (1.5%) στους Εβραίους της Νοτίου Αφρικής (Seftel et al., 1989).

Οι ετεροζυγώτες με FH, από την παιδική ακόμα ηλικία, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα LDL-C, κατά 2-3 φορές πάνω από το φυσιολογικό. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν καρδιαγγειακά προβλήματα κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής, ενώ εκτιμάται ότι κατά την ηλικία των 50 ετών το 50% των ανδρών και το 15% των γυναικών θα καταλήξουν από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι ομοζυγώτες εμφανίζονται με συχνότητα 1:1,000,000 και κληρονομούν δύο μεταλλαγμένα γονίδια για τον *LDLR*, με αποτέλεσμα να συνθέτουν πολύ μικρό αριθμό υποδοχέων, ή πολλές φορές καθόλου. Τα επίπεδα LDL-C στο πλάσμα είναι αυξημένα κατά 6-10 φορές πάνω από το φυσιολογικό και η εμφάνιση καρδιαγγειακών επεισοδίων είναι πολύ συχνή πριν την ηλικία των 20 χρόνων, ενώ είναι πιθανή και η εμφάνιση τους κατά την ενδομήτρια ζωή (θνησιγενής γέννηση).

Η αυτοσωμική επικρατής υπερχοληστερολαιμία εκτός από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR* μπορεί να οφείλεται και σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της *ApoB* (Tybjaerk-Hansen and Humphries, 1992). Η ασθένεια που προκαλείται από μετάλλαξεις στο γονίδιο αυτό είναι γνωστή ως ελαττωματική απολιποπρωτεΐναιμία B-100 (Familial Defective Apolipoprotein B-100-FDB). Η Apo-B-100 αποτελεί το συνδετικό κρίκο της LDL με τον υποδοχέα της και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκύτωση και στη λυσοσωμική αποικοδόμηση της. Συνεπώς, μεταλλαγές στον υποδοχέα, όπως παρατηρείται στην FH, ή μεταλλαγές στο συνδετικό κρίκο, όπως παρατηρείται στην FDB, οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα LDL-C. Παρ' όλα αυτά ο φαινότυπος της FDB είναι πιο ήπιος σε σχέση με της FH (Pimstone et al., 1997, Hansen et al., 1997). Η FDB αναγνωρίστηκε το 1986 σε άτομα που εμφάνισαν μέτρια υπερχοληστερολαιμία (Vega et al., 1986).

Το γονίδιο της *ApoB* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2 στη θέση 2p23-24, έχει μήκος 43Kb και αποτελείται από 29 εξόνια, που χωρίζονται από 28 εσόνια. Η πρώτη μετάλλαξη που βρέθηκε στο γονίδιο *ApoB* ήταν η R3500Q (Soria et al., 1989). Στη συνέχεια βρέθηκε στο ίδιο κωδικόνιο η μετάλλαξη R3500W (Gaffney et al., 1995). Τέλος, αναφέρθηκε και μία τρίτη μετάλλαξη, η R3531C (Pullinger et al., 1995) η οποία σε πιο πρόσφατες μελέτες φάνηκε να μην σχετίζεται με υπερχοληστερολαιμία και καρδιαγγειακά προβλήματα (Ludwig et al., 1997).

Όσον αφορά τη συχνότητα με την οποία εμφανίζονται η FDB και η FH, φαίνεται ότι η FH είναι πιο συχνή. Τέσσερις μελέτες, βασισμένες σε πληθυσμιακή γενετική ανάλυση, έχουν υπολογίσει την συχνότητα των μεταλλάξεων στο γονίδιο *ApoB*. Με ανάλυση 5,160 ατόμων στην Καλιφόρνια (Bersot et al., 1993), 9,255 ατόμων στην Κοπενχάγη (Tybjaerk-Hansen et al., 1998) και 5,000 νεογέννητων στη Δανία (Hansen et al., 1994) βρέθηκε συχνότητα για την R3500Q 1/1,250. Σε αντίθεση, ανάλυση 778 ατόμων στη Σουηδία έδειξε συχνότητα για την R3500Q 1/209

(Miserez et al., 1994). Η διαφορά μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μελέτη, γενικά όμως η συχνότητα της FDB υπολογίζεται σε 1/500-1/700 (Miserez et al., 1994).

Σε μία πρόσφατη έρευνα (Saint-Jore et al., 2000) που έγινε σε πληθυσμό υπερχοληστερολαιμικών βρέθηκε ότι το 50% των ατόμων είχαν μετάλλαξη στο *LDLR* και το 15% στο *ApoB*, ενώ το υπόλοιπο 35% δεν είχε μετάλλαξη σε κανένα από τα παραπάνω γονίδια, γεγονός που σημαίνει, ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες-γονίδια που σχετίζονται με την υπερχοληστερολαιμία.

Το 1999, οι Varret et al. εντόπισαν μια περιοχή στο χρωμόσωμα 1 (1p34.1-1p32) η οποία συνδέθηκε με την κληρονομική υπερχοληστερολαιμία (Varret et al., 1999). Η ίδια ομάδα το 2003 περιόρισε την περιοχή αυτή στη θέση 1p32 (Abifadel et al., 2003). Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το γονίδιο *PCSK9* (proprotein convertase subtilin/ kexin type 9) του οποίου ο ρόλος δεν είναι ακριβώς γνωστός. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NARC-1 (neural apoptosis regulated convertase) η οποία εκφράζεται στο ήπαρ και παίρνει μέρος στην ομοιοστάση της χοληστερόλης (Abifadel et al., 2003). Σε περιπτώσεις ασθενών με FH που δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια *LDLR* ή *ApoB*, βρέθηκαν δυο μεταλλάξεις στο γονίδιο *PCSK9* οι οποίες ήταν υπεύθυνες για τη νόσο. Ο όρος αυτοσωμική επικρατής υπερχοληστερολαιμία (Autosomal Dominant Hypercholesterolemia) δημιουργήθηκε από τους ερευνητές για να ξεχωρίσει από την FH και την FDB.

Σε επόμενες μελέτες στις οποίες ελέγχθηκε η επίδραση των μεταλλάξεων του γονιδίου *PCSK9* στον μεταβολισμό της χοληστερόλης οδήγησαν σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Κάποιοι ερευνητές (Timms et al., 2004, Leren et al., 2004a) ανέφεραν ότι οι μεταλλάξεις στο *PCSK9* ήταν η αιτία της νόσου ενώ οι Damgaard et al., δεν βρήκαν καμία συσχέτιση (Damgaard et al., 2004).

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στο εύρος της περιοχής του χρωμοσώματος 1 που αναλύθηκε. Στην πρώτη αναφορά από την ομάδα της Γαλλίας αναλύθηκε μια ευρύτερη περιοχή στο χρωμόσωμα 1 ή οποία εμπεριείχε το *PCSK9* μαζί με άλλα 42 γονίδια (Varret et al., 1999). Στις μελέτες που ακολούθησαν (Abifadel et al., 2003, Timms et al., 2004, Leren et al., 2004a, Damgaard et al., 2004) αναλύθηκε μόνο η περιοχή που βρίσκεται το γονίδιο *PCSK9*. Η αναφορά των Abifadel et al., δεν αποκλείει ότι οι μεταλλάξεις στο *PCSK9* προκαλούν ADH αλλά πιθανόν να είναι συνδεδεμένες (in linkage disequilibrium) με άλλα γονίδια της περιοχής 1p34.1-1p32 που συνδέονται με τη νόσο.

1.5 Το σύστημα μεταφοράς λιπιδίων και ο μεταβολισμός της χοληστερόλης

1.5.1 Λιπίδια του πλάσματος

Ο σκοπός τους συστήματος μεταφοράς λιπιδίων είναι η μεταφορά υδρόφοβων μορίων από τα σημεία σύνθεσης στα σημεία όπου είναι χρήσιμα (Havel 1995). Σε ένα σώμα μέσου βάρους τα λιπίδια αποτελούν το 40% των οργανικών ουσιών. Οι βασικοί τύποι λιπιδίων στο πλάσμα είναι 4: τα λιπαρά οξέα, τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια και τα στεροειδή (Genest, 2003).

Τα λιπαρά οξέα διαφέρουν σε μήκος (άτομα άνθρακα) και στην παρουσία ενός (μονοακόρεστα) ή περισσότερων διπλών δεσμών (πολυακόρεστα) μεταξύ των ατόμων του άνθρακα.

Τα τριγλυκερίδια αποτελούν την πλειονότητα των λιπιδίων του σώματος και σχηματίζονται από την ένωση ενός μορίου γλυκερόλης και τριών μόρια λιπαρών οξέων. Τα τριγλυκερίδια είναι μη πολικά υδροφοβικά μόρια (Genest, 2003).

Τα φωσφολιπίδια είναι στη δομή τους παρόμοια με τα τριγλυκερίδια με διαφορά στη σύνδεση της γλυκερόλης, με δύο λιπαρά οξέα και μία φωσφορική ομάδα. Αποτελούν κύριο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών κι εμπλέκονται στη μεταγωγή σημάτων.

Τα στεροειδή αποτελούνται από συνδεδεμένους δακτυλίους ατόμων άνθρακα στους οποίους πολλές φορές συνδέονται πολικές ομάδες. Στην κατηγορία των στεροειδών ανήκουν η χοληστερόλη, η κορτιζόλη των επινεφριδίων καθώς και ορμόνες όπως η τεστοστερόνη και τα οιστρογόνα.

Η χοληστερόλη αποτελείται από 27 άτομα άνθρακα και είναι απαραίτητο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, τη σύνθεση των στεροϊδών ορμονών και των χολικών οξέων (Tabas, 2002). Η συγκέντρωση της χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες είναι πολύ σημαντική για την κυτταρική λειτουργία και γι' αυτό η είναι απαραίτητη η ρύθμισή της. Οι ανάγκες του κυττάρου σε χοληστερόλη καλύπτονται είτε από τη *de novo* σύνθεση της στα κύτταρα είτε από την λήψη μέσω της διατροφής. Η χοληστερόλη που δεν χρησιμοποιείται από τα κύτταρα εστεροποιείται και αποθηκεύεται σε μορφή εστέρων χοληστερόλης, ενώ η απομάκρυνσή της από αυτά γίνεται μέσω της αντίστροφης μεταφοράς (reverse cholesterol transport) (Groen et al., 2004).

1.5.2 Λιποπρωτεΐνες και απολιποπρωτεΐνες

Καθώς τα λιπίδια είναι υδροφοβικά μόρια πακετάρονται σε μόρια λιποπρωτεϊνών. Οι λιποπρωτεΐνες είναι μακρομόρια που ποικίλουν σε μέγεθος και

σύσταση υδατικών υλικών (πλάσμα), λιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών. Τα είδη των λιποπρωτεϊνών είναι πέντε: χυλομικρά, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (very low density lipoprotein-VLDL), ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (intermediate density lipoprotein-IDL), LDL και HDL. Οι λιποπρωτεΐνες χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση το περιεχόμενο τους σε πρωτεΐνες και λιπίδια, και τα οποία ορίζουν το μέγεθος και την πυκνότητά τους, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1.1**.

Οι απολιποπρωτεΐνες συμμετέχουν σε 4 σημαντικές λειτουργίες: στο πακετάρισμα και έκκριση των λιποπρωτεϊνών (Apo-B-100 και B-48), στη δομή των λιποπρωτεϊνών (Apo-B, E, A-I, A-II), λειτουργούν ως συνεργοί ενζύμων (Apo-A-I, C-II, C-III) και προσδένονται σε υποδοχείς και πρωτεΐνες κυτταρικής πρόσληψης (**Πίνακας 1.1**) (Genest, 2003).

Πίνακας 1.1. Σύσταση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος

Λιποπρωτεΐνη	Σύνθεση	Μέγεθος nm	% Πρωτεΐνη	Συγκέντρωση χοληστερόλης mmol/L	Συγκέντρωση TG mmol/L	Κύρια Απολιποπρωτεΐνη
Χυλομικρά	Έντερο	100-1000	1-2	0,0	0	B-48
VLDL	Ήπαρ	40-50	10	0.1-0.4	0.2-1.2	B-100
IDL	VLDL	25-30	18	0.1-0.3	0.1-0.3	B-100, E
LDL	IDL	20-25	25	1.5-3.5	0.2-0.4	B-100
HDL	Διάφορα	6-10	40-55	0.9-1.6	0.1-0.2	A-I

1.5.3 Ρύθμιση της HMG-CoA αναγωγάσης από την LDL σε ινοβλάστες

Το ένζυμο που ρυθμίζει τη σύνθεση της χοληστερόλης είναι η 3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλο-CoA αναγωγάση (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase- HMG-CoA reductase). Η δράση του ενζύμου σε ήπαρ ποντικών μειώνεται όταν στα ποντίκια χορηγηθεί χοληστερόλη και αυτή η μείωση οδηγεί στην ελάττωση της σύνθεσης της LDL (Bucher et al., 1960, Siperstein, 1970). Σε ινοβλάστες που καλλιιεργήθηκαν παρουσία ορού η δράση της HMG-CoA αναγωγάσης ήταν πολύ χαμηλή. Όταν αφαιρέθηκαν οι λιποπρωτεΐνες η δράση της HMG-CoA αναγωγάσης αυξήθηκε κατά 50 φορές μέσα σε 24 ώρες. Από τις λιποπρωτεΐνες που φέρουν χοληστερόλη (LDL-C, HDL-C) μόνο η LDL επηρεάζει τη δράση της HMG-CoA αναγωγάσης (Goldstein et al., 1973a, Brown et al., 1973).

Μελέτες σε κύτταρα ομοζυγών με FH έδειξαν ότι στις καλλιέργειες με ύπαρξη λιποπρωτεϊνών η δράση της HMG-CoA αναγωγάσης ήταν 50-100 φορές πάνω από το φυσιολογικό. Αυτή η δράση δεν μεταβαλλόταν όταν οι λιποπρωτεΐνες απομακρύνονταν από το καλλιιεργητικό υλικό ούτε όταν προσέθεταν LDL. Έτσι οι

ερευνητές υπέθεσαν ότι οι ομοζυγώτες με FH έφεραν κάποια μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη HMG-CoA αναγωγή. Η υπόθεση αυτή απορρίφθηκε αμέσως όταν με μια σειρά πειραμάτων φάνηκε ότι το πρόβλημα βρίσκεται στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από την LDL και όχι στην ικανότητα της χοληστερόλης να δράσει στα κύτταρα αφού ήδη απομακρυνθεί από την LDL (Goldstein et al., 1973a, Brown et al., 1974).

1.5.4 Το σύστημα μεταφοράς της χοληστερόλης

Η ύπαρξη του LDL-R επιβεβαιώθηκε από την ομάδα του Goldstein με την επώαση ινοβλαστών με ραδιοσημασμένη ¹²⁵I-LDL από ομόζυγους ασθενείς με FH (Goldstein et al., 1974a). Η σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα αποκάλυψε ότι στην επιφάνεια των φυσιολογικών υπήρχαν πολλά σημεία πρόσδεσης υψηλής συγγένειας τα οποία έλειπαν από τα μεταλλαγμένα (Goldstein et al., 1974a). Στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι η LDL παραμένει στα σημεία πρόσδεσης για λιγότερο από 10 λεπτά και μέσα σε 60 λεπτά εισέρχεται στο κύτταρο και διασπάται σε αμινοξέα ενώ παράλληλα οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται (Goldstein et al., 1975).

Η μελέτη του μορίου της χοληστερόλης έχει συμβάλλει σε 13 βραβεία Νόμπελ (Genest 2003). Αν και η υδρόφοβη φύση της είναι αυτή που καθιστά την χοληστερόλη δομικό υλικό των κυτταρικών μεμβρανών, η ίδια την καθιστά και επιβλαβή καθώς η εναπόθεσή της σε σημεία όπως τα τοιχώματα των αρτηριών οδηγεί στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας. Για το λόγο αυτό η συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα πρέπει να παραμένει σε χαμηλά επίπεδα.

Το πρόβλημα μεταφοράς της χοληστερόλης αντιμετωπίζεται με την εστεροποίηση της χοληστερόλης. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν τη εστεροποιημένη στερόλη από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (**Εικόνα 1.2**). Έτσι η χοληστερόλη έχει δομή που μοιάζει με “σταγόνα λαδιού” η οποία αποτελείται από εστέρες χοληστερόλης και τριγλυκερίδια και στην εξωτερική πλευρά από μια μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και μη εστεροποιημένη χοληστερόλη. Η μικρή ποσότητα μη εστεροποιημένης χοληστερόλης στην επιφάνεια βρίσκεται σε ισορροπία με τη χοληστερόλη των κυτταρικών μεμβρανών αλλά οι μεγαλύτερες ποσότητες βρίσκονται στο εσωτερικό του σχηματισμού (Brown και Goldstein, 1985).

Καθώς οι εστέρες χοληστερόλης είναι υδρόφοβα μόρια και δεν διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες η μεταφορά τους επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων των λιποπρωτεϊνών, και πιο συγκεκριμένα τον LDL-R. Οι LDL-Rs βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων, σε αυτούς προσδένεται η LDL και με ενδοκύτωση μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Στη συνέχεια η λιποπρωτεΐνη μεταφέρεται στα λυσοσώματα όπου οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται. Η χοληστερόλη που

ελευθερώνεται χρησιμοποιείται από το κύτταρο για τη σύνθεση μεμβρανών, χολικών οξέων και στεροειδών ορμονών ή αποθηκεύεται με τη μορφή κυτταροπλασματικών σταγονιδίων εστέρων χοληστερόλης (Brown και Goldstein, 1985). Η χοληστερόλη που ελευθερώνεται στα λυσσοσώματα από την LDL είναι υπεύθυνη για τη μείωση της δράσης της HMG-CoA αναγωγάσης (Luskey, 1983). Επιπλέον, σχετίζεται με την αύξηση της δραστηριότητας της ακυλοτρανσφεράσης (άκυλο-CoA) της χοληστερόλης (cholesterol acetyltransferase, ACAT) η οποία είναι υπεύθυνη για την εστεροποίηση της χοληστερόλης και την αποθήκευσή της στο κυτταρόπλασμα (Goldstein, 1974b) και τέλος ρυθμίζει την έκφραση των LDL-Rs μειώνοντας τη συγκέντρωση του mRNA (**Εικόνα 1.3**) (Brown and Goldstein, 1975, Russel, 1983).

Η ενδοκύτωση είναι μία διαδικασία που περιγράφηκε πρώτη φορά γύρω στο 1930 για τα φαγοκύτταρα ενώ η ύπαρξή της και στους άλλους τύπους κυττάρων επιβεβαιώθηκε το 1953. Παρ' όλα αυτά η περιγραφή της δεν περιελάμβανε την εισαγωγή υποδοχέων στα κύτταρα (Palade, 1953). Η συσχέτιση της LDL με την ενδοκύτωση ξεκίνησε με έρευνες το 1975 όπου επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του LDL-R σε μορφή καλυμμένων εσοχών (Anderson, 1976).

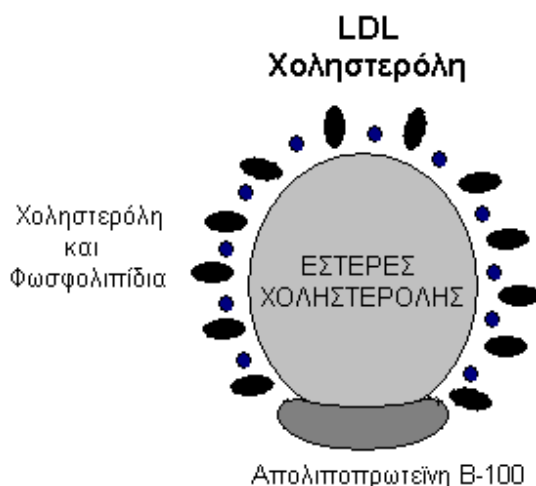
Η λειτουργία των καλυμμένων εσοχών και η σημαντικότητά τους επιβεβαιώθηκε από την μελέτη ινοβλαστών ομοζυγών ασθενών με FH. Στα περισσότερα άτομα δεν ήταν δυνατή η πρόσδεση της LDL στην επιφάνεια των κυττάρων και σε έναν ασθενή δεν ήταν δυνατή η εισαγωγή της στο κύτταρο μέσω καλυμμένων εσοχών (Brown et al., 1976, Goldstein et al., 1977). Σε αυτά τα μεταλλαγμένα κύτταρα οι LDL-Rs δεν υπήρχαν στις καλυμμένες εσοχές (Anderson et al., 1977). Παρά το γεγονός ότι μεγάλες ποσότητες χοληστερόλης μεταφέρονται στους ιστούς και ταυτόχρονα η συγκέντρωση της LDL στο αίμα διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα τα παραπάνω αποδίδονται σε δύο ιδιότητες των LDL-Rs: (1) την ικανότητα τους να προσδένονται στην LDL και (2) την ικανότητά τους να ανακυκλώνονται πολλές φορές μέσα στο κύτταρο. Όταν η λειτουργία των υποδοχέων αναστέλλεται λόγω γενετικών διαταραχών αυτός ο προστατευτικός μηχανισμός χάνεται και η χοληστερόλη αυξάνεται στο πλάσμα με αποτέλεσμα τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.

Τα τριγλυκερίδια που προσλαμβάνονται από τη διατροφή μεταφέρονται από το λεπτό έντερο στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς με τη μορφή χυλομικρών. Στο λιπώδη ιστό και του μύες η λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase-LPL) υδρολύει τα τριγλυκερίδια των χυλομικρών. Τα υπολείμματα χυλομικρών απομακρύνονται μέσω της πρόσδεσης της Apo-E που βρίσκεται στην επιφάνειά τους με τον LDL-R (Mahley και Rall, 2002).

Η χοληστερόλη που συντίθεται στο ήπαρ, και η χοληστερόλη που φτάνει στο

ήπαρ μέσω χυλομικρών πακετάρεται σε VLDL και εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η VLDL είτε απομακρύνεται άμεσα από το ήπαρ ή μετατρέπεται σταδιακά σε LDL.

Η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης επιτρέπει την απομάκρυνση της χοληστερόλης από τους εξωηπατικούς ιστούς στο ήπαρ με τελικό στόχο την έκκρισή της στη χολή. Η πρόσληψη της HDL από το ήπαρ γίνεται από τους εκκαθαριστές υποδοχείς BI (scavenger receptors BI). Οι εστέρες μεταφέρονται από την HDL στην VLDL και LDL μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς των εστέρων χοληστερόλης (cholesteryl ester transfer protein-CETP). Τελικά η χοληστερόλη μεταφέρεται στη χολή είτε σε μορφή ελεύθερης χοληστερόλης είτε με τη μορφή χολικών αλάτων που έχουν δημιουργηθεί στο ήπαρ από χολικά οξέα.



Εικόνα 1.2. Ο σχηματισμός της LDL από χοληστερόλη και εστέρες χοληστερόλης. Η LDL έχει σφαιρικό σχήμα, μάζα 3×10^6 KDa, και διάμετρο 22nm. Κάθε μόριο LDL περιέχει 1,500 μόρια εστέρων χοληστερόλης τα οποία περιβάλλονται από 800 μόρια φωσφολιπιδίων, από 500 μόρια μη εστεροποιημένης χοληστερόλης και από ένα μόριο Apo-B-100 με μάζα 387KDa.

1.6 Αθηροσκλήρυνση

Σήμερα, είναι γνωστές οι κυτταρικές διαδικασίες που συνδέουν παράγοντες κινδύνου, όπως τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, με την εξέλιξη της αθηροσκλήρυνσης και με την ανάπτυξη CAD.

Οι αθηρωματικές περιοχές είναι ετερογενείς όσον αφορά την κυτταρική σύσταση τους, και περιέχουν ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες και μακροφάγα που το καθένα συμμετέχει στην δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (Ross, 1993). Το οξειδωτικό stress έχει παθογενετική σημασία στην

αθηροσκλήρυνση. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) εμπλέκονται στον “τραυματισμό” των αγγείων μέσω της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών, στη δημιουργία αφρωδών κυττάρων, και στην υπερτροφία των λείων μυϊκών κυττάρων. Επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον στην FH είναι γνωστό ότι λόγω της δυσλειτουργίας του LDL-R υπάρχει συσσώρευση και παραμονή της χοληστερόλης για μεγάλο χρονικό διάστημα στο πλάσμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των ανώτερων λιποπρωτεϊνών στο πλάσμα τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα με την οποία διεισδύουν στο αρτηριακό τοίχωμα αλλά και η πιθανότητα οξειδωσης της LDL, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας (Steinberg και Witztum, 2002, Zaman et al., 2000, Witzum και Steinberg, 1991, Chisolm και Steinberg, 2000, Witztum, 1998, Catheart et al., 1988). Η είσοδος των λιποπρωτεϊνών στα τοιχώματα των αρτηριών οδηγεί στην έκκριση φλεγμονωδών μεσολαβητών οι οποίοι επιτρέπουν την πρόσδεση της LDL στο ενδοθήλιο αλλά και περαιτέρω συνέχιση της φλεγμονής (Ross, 1999, Zaman et al., 2000). Τα αυξημένα επίπεδα της LDL έχουν συσχετιστεί με αυξημένη οξειδωση των μορίων. Η οξειδωση της LDL αναφέρεται στη οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και στην τροποποίηση που προκαλούν στα συνυπάρχοντα μόρια των πρωτεϊνών. Η οξειδωμένη LDL (oxLDL) έχει την ικανότητα πρόσδεσης στην εξωκυτταρική ύλη, επομένως η παραμονή της εκεί συμβάλλει στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας (Schnor et al., 2002). Επιπλέον, η υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων οδηγεί στην παραγωγή αλδεϋδών και κετονών οι οποίες εξουδετερώνουν τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα της Apo-B που συμβάλλουν στην αναγνώριση της LDL από τον LDL-R (Heinecke et al., 2002). Τα αμινοξέα λυσίνης που βρίσκονται στην Apo-B είναι απαραίτητα για την πρόσληψη της LDL από τον LDL-R, όμως όταν η LDL έχει υποστεί οξειδωση και περιέχει τροποποιημένη Apo-B δεν προσλαμβάνεται από τον LDL-R αλλά από τους εκκαθαριστές υποδοχείς (scavenger receptors) στα μακροφάγα. Συνεπώς, τα μακροφάγα, προσλαμβάνοντας οξειδωμένη LDL, μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα (Febbraio et al., 2002, Furhman et al., 2002).

Πέρα από την μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα και την πρόκληση βλάβης στην ενδοθηλιακή στιβάδα του αγγείου, η oxLDL έχει και άλλες ιδιότητες. Έχει την ικανότητα να προσελκύει μονοκύτταρα στα αρτηριακά τοιχώματα, τα οποία σταδιακά τροποποιούνται σε μακροφάγα και στη συνέχεια σε αφρώδη κύτταρα, να μειώνει την κινητικότητα των μακροφάγων, να εμποδίζει την έκκριση μονοξειδίου του αζώτου και να προάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων (Zaman et al., 2000, Witzum και Steinberg, 1991, Chisolm και Steinberg, 2000, Prescott et al., 2002).

Η αθηροσκλήρυνση στους ασθενείς με FH είναι εμφανής σε πολύ νεαρή

ηλικία, συνήθως κατά τη δεύτερη δεκαετία ζωής (Berenson et al., 1991). Άλλες αναφορές δείχνουν ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στις αρτηρίες του βραχίονα είναι εμφανής από την ηλικία των 10 ετών σε παιδιά με FH (Celermajer et al., 1992) και είναι αναστρέψιμη με υπολιπιδαιμική θεραπεία (Drexler et al., 1991).

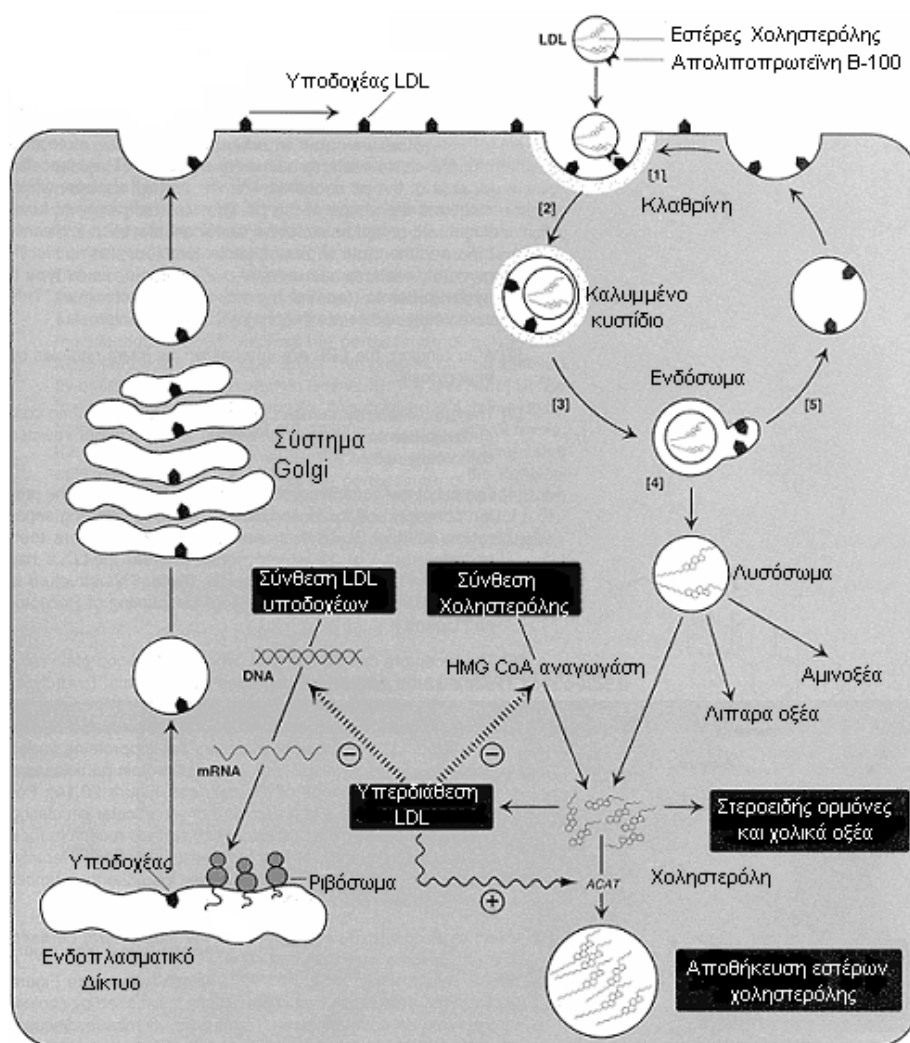
1.7 Ο LDL-R

Ο LDL-R είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 160KDa. Ο LDL-R προσδένεται σε δύο πρωτεΐνες, την Apo-B-100 με μοριακό βάρος 387KDa, η οποία αποτελεί τη “βάση” της LDL και την Apo-E με μοριακό βάρος 34KDa η οποία βρίσκεται στην IDL και στη HDL. Η πρόδρομη μορφή του LDL-R η οποία αποτελείται από 860 αμινοξέα συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων (Tolleshaug et al., 1982). Στη συνέχεια μεταφέρεται στο σύστημα Golgi όπου υφίσταται N και O-συνδεδεμένη γλυκοσυλίωση. Μέσα σε 30 λεπτά από τη σύνθεσή του το μοριακό βάρος αυξάνεται από 120KDa στα 160KDa. Συγχρόνως, η O-συνδεδεμένη αλυσίδα επιμηκύνεται από την προσθήκη μίας γαλακτόζης και ενός ή δύο μορίων σιαλικού οξέος. Η ποσότητα των υδατανθράκων δεν δικαιολογεί την αύξηση του μοριακού βάρους, αντίθετα αυτό δικαιολογείται από την αλλαγή της μορφολογίας της πρωτεΐνης λόγω της επιμήκυνσης των O-συνδεδεμένων σακχάρων (Cummins et al., 1983).

Περίπου μέσα σε 45 λεπτά από τη σύνθεσή τους, οι LDL-Rs μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου όπου συγκεντρώνονται σε καλυμμένες εσοχές κλαθρίνης. Μέσα στα επόμενα 3-5 λεπτά εγκολπώνονται για να σχηματίσουν καλυμμένα κυστίδια. Η κλαθρίνη στη συνέχεια απομακρύνεται και πολλά κυστίδια ενώνονται για να δημιουργήσουν ενδοσώματα (Pastan et al., 1983). Το pH των ενδοσωμάτων μειώνεται κάτω από 6.5 λόγω της λειτουργίας μιας αντλίας πρωτονίων στη μεμβράνη (Maxfield 1982, Pastan et al., 1983). Σε αυτό το όξινο περιβάλλον η LDL απομακρύνεται από τον LDL-R, ο LDL-R επιστρέφει στην επιφάνεια του κυττάρου ενώ η LDL διασπάται στα λυσοσώματα όπως έχει προαναφερθεί. Ο LDL-R κάνει την ίδια διαδρομή περίπου κάθε 10 λεπτά (**Εικόνα 1.3**).

1.7.1 Δομή του LDL-R

Στο αμινοτελικό (NH₂) άκρο του LDL-R βρίσκονται 21 αμινοξέα τα οποία αποτελούν μία υδρόφοβη αλληλουχία έναρξης που απομακρύνεται από την πρωτεΐνη αμέσως μετά τη μετάφρασή της. Ο ώριμος LDL-R αποτελείται από 839 αμινοξέα και χωρίζεται σε πέντε περιοχές (**Εικόνα 1.4**).



Εικόνα 1.3. Ο κύκλος του LDL-R στα κύτταρα.

Η πρώτη περιοχή ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο, αποτελεί το σημείο δέσμευσης του υποδοχέα με το υπόστρωμα του και αποτελείται από 292 αμινοξέα. Σ' αυτό το άκρο υπάρχει μια αλληλουχία 40 αμινοξέων η οποία επαναλαμβάνεται 7 φορές. Κάθε επανάληψη περιλαμβάνει 6 υπολείμματα κυστεΐνης (Scneider et al., 1983). Η έντονη παρουσία δισουλφιδικών δεσμών στην περιοχή αποδίδει μεγάλη σταθερότητα στο σημείο δέσμευσης του υποδοχέα. Η σταθερότητα αυτή μπορεί να τον προστατέψει από τις έντονες αλλαγές του pH που συναντώνται κατά τη φάση της ανακύκλωσης (Brown et al., 1983). Χαρακτηριστικό της περιοχής είναι τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα τα οποία βρίσκονται στο COOH άκρο κάθε επανάληψης (Goldstein et al., 1985) και είναι συμπληρωματικά κάποιων θετικά φορτισμένων αμινοξέων τα οποία βρίσκονται στην α-έλικα στην Aro-E που προσδένεται στον LDL-R (Innerarity et al., 1984).

Η δεύτερη περιοχή αποτελείται από 400 αμινοξέα και είναι ομόλογη κατά 35%

με το εξωκυτταρικό τμήμα του πρόδρομου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor-EGF). Εκεί είναι η πιθανή θέση που γίνεται η N-συνδεδεμένη γλυκοσυλίωση κατά την ωρίμανση του υποδοχέα (Yamamoto et al., 1984).

Η τρίτη περιοχή βρίσκεται ακριβώς πριν από το σημείο όπου ο LDL-R διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Αποτελείται από 58 αμινοξέα και είναι πλούσια σε θρεονίνη και σερίνη (Yamamoto et al., 1984). Σ' αυτή την περιοχή γίνεται η O-συνδεδεμένη γλυκοσυλίωση κατά την ωρίμανση του υποδοχέα (Russell et al., 1984). Η τέταρτη περιοχή περιλαμβάνει 22 υδρόφοβα αμινοξέα που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη (Yamamoto et al., 1984, Russell et al., 1984).

Η πέμπτη περιοχή αποτελείται από 50 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο και εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεριά της μεμβράνης (Yamamoto et al., 1984, Russell et al., 1984). Η "ουρά" αυτή δίνει τη δυνατότητα στους υποδοχείς να κινούνται πλευρικά με αποτέλεσμα να συναθροίζονται στις καλυμμένες εσοχές.



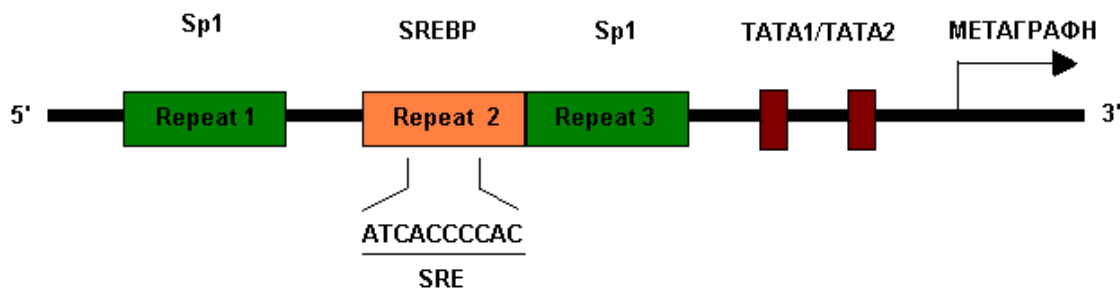
Εικόνα 1.4. Ο LDL-R χωρίζεται σε πέντε περιοχές.

1.7.2 Το γονίδιο του *LDLR*

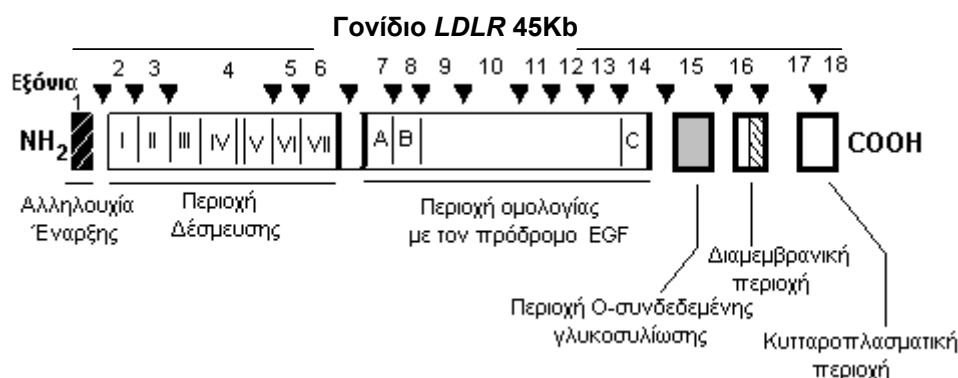
Το γονίδιο του *LDLR* κλωνοποιήθηκε το 1984 ενώ η χαρτογράφηση του έγινε το 1985 (Yamamoto et al., 1984, Francke et al., 1984). Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 στη θέση 19p13.1-3, έχει μήκος 45Kb και αποτελείται από 18 εξόνια που χωρίζονται από 17 εσόνια (Sudhof, 1985). Ο υποκινητής βρίσκεται στο 5' άκρο, και μεταξύ των θέσεων -58 και -234 βρίσκονται τα περισσότερα *cis* DNA δρώντα στοιχεία, με +1 την Α του κωδικόνιου έναρξης της μεθειονίνης. Ο υποκινητής αποτελείται από 177 ζεύγη βάσεων. Περιλαμβάνει τρεις επαναλαμβανόμενες περιοχές (repeats), δύο αλληλουχίες που συνιστούν τα κουτιά TATA, και αρκετά σημεία εκκίνησης της

μεταγραφής, όλα απαραίτητα για τη ρύθμισή και την έκφραση του (**Εικόνα 1.5**) (Südhoff et al., 1987). Από τις τρεις επαναλήψεις η 1 και 3 περιέχουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Ο ρόλος τους είναι να διατηρούν σταθερά τα επίπεδα μεταγραφής ανεξάρτητα από την ύπαρξη στερολών, η παρουσία τους όμως δεν είναι επαρκής για την υψηλή μεταγραφή του LDL-R απουσίας στερολών, όπου η συνεισφορά της επανάληψης 2 είναι απαραίτητη (Südhoff et al., 1987, Chang et al., 1996). Η επανάληψη 2 περιέχει μια αλληλουχία 10bp γνωστή ως στοιχείο ρύθμισης στερόλης (sterol regulatory element-SRE) το οποίο αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες πρόσδεσης του στοιχείου ρύθμισης της στερόλης (sterol regulatory element binding proteins-SREBP). Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης ρυθμίζεται η μεταγραφή του *LDLR* που εξαρτάται από την ύπαρξη στερολών (Smith et al., 1990). Το mRNA του LDL-R έχει μέγεθος 5.3Kb και περιέχει μια μη μεταφραζόμενη περιοχή 2.5Kb στο 3' άκρο (3' untranslated region-3' UTR) (Yamamoto et al., 1994). Υπάρχουν τρεις περιοχές πλούσιες σε AU (AU rich elements-ARE) στο 5' άκρο και τρία αντίγραφα επαναλήψεων Alu στο 3' άκρο της UTR. Αυτές οι περιοχές παίζουν ρόλο στην διατήρηση της σταθερότητας του mRNA του LDL-R και δρουν ως cis στοιχεία στη μεταμεταγραφική ρύθμιση του LDL-R (Yamamoto et al., 1994, Südhoff et al., 1987).

Τα εξόνια του γονιδίου έχουν άμεση σχέση με τα λειτουργικά τμήματα της πρωτεΐνης. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την αλληλουχία έναρξης και τα εξόνια 2-6 την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος. Τα εξόνια 7-14 κωδικοποιούν την περιοχή που είναι ομόλογη στο πρόδρομο EGF, το εξόνιο 15 την τρίτη περιοχή και το εξόνιο 16 και μέρος του εξονίου 17 τα 22 αμινοξέα της διαμεμβρανικής περιοχής. Τέλος, το υπόλοιπο κομμάτι του εξονίου 17 και μέρος του 18 κωδικοποιούν την κυτταροπλασματική περιοχή (**Εικόνα 1.6**).



Εικόνα 1.5. Η περιοχή του υποκινητή του *LDLR*. Παρουσιάζονται οι 3 περιοχές επανάληψης (Repeat 1-3), οι αλληλουχίες TATA. Το cis σημείο δράσης των στερολών στην επανάληψη 2, και τα σημεία αναγνώρισης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1.



Εικόνα 1.6. Συσχέτιση των εξονίων του γονιδίου με τις περιοχές της πρωτεΐνης στον ανθρώπινο LDL-R. Με βέλη συμβολίζονται τα σημεία στα οποία παρεμβάλλονται τα εσόνια.

1.7.3 Μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR*

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω 900 μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR* (www.ucl.ac.uk/fh.3 και www.umd.necker.fr). Σε επίπεδο cDNA οι περισσότερες είναι μεταλλάξεις σημείου (~840) εκ των οποίων: 610 αντικαταστάσεις, 121 μικρές ελλείψεις, 53 μικρές ενθέσεις ή διπλασιασμοί. Σε γενομικό επίπεδο υπάρχουν ακόμη 57 αντικαταστάσεις σε εσόνια, από τις οποίες σε ποσοστό 65% επηρεάζουν τα σημεία ματίσματος (+1, +2, -1, and -2). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο: 507 (58.9%) είναι παρερμηνεύσιμες (missense), 103 ανερμηνεύσιμες (nonsense), το 21.1% είναι μικρές ανακατατάξεις (minor rearrangements), το 13% μεγάλες ανακατατάξεις (major rearrangements) και το 6.6% είναι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στα όρια μεταξύ εσονίων και εξονίων (splice site mutations). Στην κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα έχει βρεθεί το 3.4% των μεταλλάξεων (3.2% στο εξόνιο 17 και 0.2% στο εξόνιο 18), 1.7% στη διαμεμβρανική περιοχή και στον υποκινητή και 1.4% στην Ο-συνδεσμένη γλυκοζυλιωμένη περιοχή. Όσον αφορά τις μεγάλες ανακατατάξεις, βρίσκονται σε όλο το μήκος του γονιδίου και μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 92, στις οποίες το μέγεθος του DNA που εξαλείφεται ποικίλλει από 37bp στο εξόνιο 4 (Giesel et al., 1995) μέχρι >25Kb έλλειψη του εσονίου 11 μέχρι το 3' άκρο, FH Catania (Bertolini et al., 2000). Στους γενετικά ανομοιογενείς πληθυσμούς περίπου το 5% των μεταλλάξεων είναι μεγάλες ανακατατάξεις (Sun et al., 1992, Fouchier et al., 2001). Από τις μεταλλάξεις που έχουν αναφερθεί παγκοσμίως οι περισσότερες είναι στο εξόνιο 4 (**Εικόνα 1.7**).

Όσον αφορά την επίδραση που έχουν οι μεταλλάξεις στον κύκλο του LDL-R στα κύτταρα, χωρίζονται σε 5 κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία μεταλλάξεων οδηγεί σε μη ανιχνεύσιμο αριθμό πρωτεϊνικών προϊόντων (null alleles), έχουν δηλαδή ως αποτέλεσμα να μην παράγονται καθόλου υποδοχείς ή να παράγονται σε μικρές

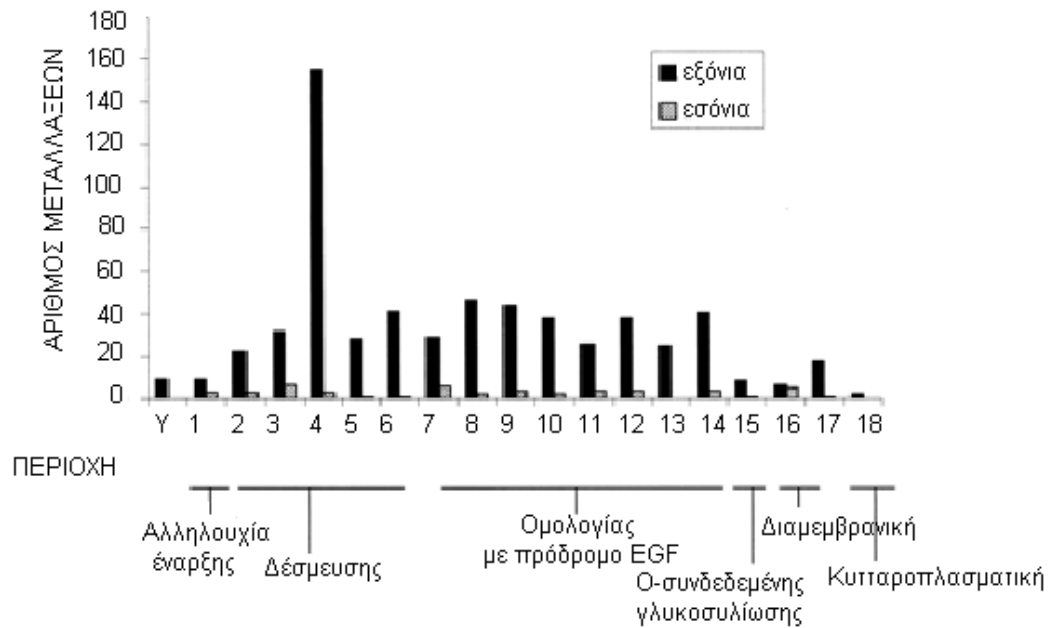
ποσότητες. Συχνά οφείλονται σε αντικατάσταση αμινοξέος από κωδικόνιο λήξης (ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις).

Η δεύτερη κατηγορία προκαλεί την αργή μεταφορά του LDL-R από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο Golgi. Οι υποδοχείς που παράγονται από τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα δεν φτάνουν στην επιφάνεια του κυττάρου αντίθετα μετακινούνται (α) αργά ή (β) καθόλου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi (transport defective alleles) (Esser et al., 1988, Leitersdorf, 1988). Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν οι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις και οι ελλείψεις ενός αμινοξέος. Στη δεύτερη ανήκουν ελλείψεις στην πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή. Το μοριακό βάρος των υποδοχέων, σε αυτή την περίπτωση, ποικίλει από 100-130KDa. Οι περισσότεροι υποδοχείς έχουν μοριακό βάρος παρόμοιο με του πρόδρομου υποδοχέα.

Η τρίτη κατηγορία μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση υποδοχέων που ενώ μεταφέρονται στην επιφάνεια του κυττάρου δεν έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν την LDL (binding defective alleles). Οφείλονται είτε σε αντικαταστάσεις είτε σε ανακατατάξεις στην πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή, αλλά και σε ελλείψεις στην περιοχή ομολογίας με το πρόδρομο EGF. Στις μεταλλάξεις αυτού του είδους ο υποδοχέας παρουσιάζει πρόβλημα σύνδεσης με την Apo-B (Hobbs et al., 1990).

Η παρουσία μεταλλάξεων της τέταρτης κατηγορίας οδηγεί στη σύνθεση υποδοχέων οι οποίοι δεν έχουν την ικανότητα να συγκεντρώνονται σε καλυμμένες εσοχές και γι' αυτό δεν είναι δυνατή η ενδοκύτωσή τους (internalization defective alleles). Οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα στις περιοχές 3 και 4. Στην περιοχή 3 έχει βρεθεί μία μετάλλαξη στο εξόνιο 17. Αφορά την εισαγωγή μιας αλληλουχίας 4 βάσεων που οδηγεί σε κωδικόνιο λήξης. Στην περιοχή 4 έχει αναφερθεί η μετάλλαξη FH-Rochester που οφείλεται σε μια μεγάλη έλλειψη (5.5Kb) στα εξόνια 16, 17 και μέρος του 18 (Lehrman et al., 1985).

Τέλος, οι υποδοχείς που κωδικοποιούνται από αλληλόμορφα που φέρουν μεταλλάξεις της πέμπτης κατηγορίας δεν έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύονται από την LDL μετά από την είσοδό τους στο κύτταρο άλλα ούτε και να επιστρέφουν στην επιφάνεια του κυττάρου και τελικά αποικοδομούνται (recycling defective alleles). Οι μεταλλάξεις αυτές παρατηρούνται στην περιοχή 3 η οποία συμμετέχει στην δέσμευση και την αποδέσμευσή της LDL. Παράδειγμα τέτοιας μετάλλαξης είναι η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη στο εξόνιο 9 στη θέση 1285 που δημιουργείται από αντικατάσταση γουανίνης με αδενίνη (Leitersdorf et al., 1989).



Εικόνα 1.7. Θέση 647 διαφορετικών μεταλλάξεων (εκτός μεγάλων ανακατατάξεων) στον υποκινητή (Y), τα εξόνια και τα εσόνια του *LDLR* (Πηγή Austin et al., 2004).

1.7.4 Η έκφραση του *LDLR* *in vivo*

Τα πρώτα πειράματα για την έκφραση του LDL-R *in vivo* ξεκίνησαν το 1975. Αρχικά απομονώθηκαν λεμφοκύτταρα από το αίμα τα οποία επωάστηκαν για 67 ώρες χωρίς εξωγενή χοληστερόλη. Υπό αυτές τις συνθήκες η έκφραση των LDL-R στα λεμφοκύτταρα ήταν πολύ μεγάλη και μετρήθηκε με την πρόσδεση και την απελευθέρωση ^{125}I -LDL (Ho et al., 1976). Σε λεμφοκύτταρα τα οποία είχαν απομονωθεί από ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες με FH η έκφραση των LDL-R ήταν αντίστοιχα μη ανιχνεύσιμη ή πολύ χαμηλή να υπήρχε μόνο ένα λειτουργικό γονίδιο (Bilheimer et al., 1979).

Σε πειράματα αναφορικά με την αποσύνθεση της απομονωμένης από πλάσμα ^{125}I -LDL που χορηγήθηκε ενδοφλέβια με ένεση, φάνηκε ότι η απομάκρυνση της από την κυκλοφορία ήταν πιο αργή στους ομοζυγώτες και ετεροζυγώτες με FH σε σχέση με φυσιολογικά άτομα (Langer et al., 1972, Bilheimer et al., 1979, Simons et al., 1975). Επιπλέον, μελέτες σε ανθρώπινους και ζωικούς ιστούς έδειξαν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα LDL-R παράγεται στο ήπαρ (Kovanen et al., 1979).

Μεγάλες ποσότητες ηπατικών LDL-R παρατηρήθηκαν και όταν ενέσιμη ραδιοσημασμένη LDL χορηγήθηκε στη κυκλοφορία πειραματόζων και μετρήθηκε η πρόσληψή της από διάφορους ιστούς. Περίπου το 70% απορροφήθηκε από το ήπαρ (Pittman et al., 1982).

1.8 Έλλειψη υποδοχέων LDL-R

Μελέτες σε ομοζυγώτες ασθενείς με FH έχουν δείξει ότι διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR* οδηγούν στην παραγωγή υποδοχέων με διαφορετική δράση. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι των μεταλλάξεων: α) αυτές που δημιουργούν φαινότυπο ελαττωματικού υποδοχέα (defective) και β) αυτές που δημιουργούν φαινότυπο αρνητικού υποδοχέα (negative). Ανάλογα με το είδος της μετάλλαξης η λειτουργικότητα του LDL-R κυμαίνεται από 0% έως 30%. Οι μεταλλάξεις οι οποίες μειώνουν τη δράση του LDL-R στο 2-30% χαρακτηρίζονται ως ελαττωματικού υποδοχέα και εκείνες που μειώνουν τη λειτουργικότητα του LDL-R κάτω από 2% ως αρνητικού υποδοχέα. Η μεγάλη ετερογένεια στο φαινότυπο της FH μπορεί να οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους μεταλλάξεων (Hobbs et al., 1992, Bertolini et al., 1999).

1.9 Διάγνωση της FH

1.9.1 Βιοχημική διάγνωση

Για τη διάγνωση της FH χρειάζονται τουλάχιστον δύο μετρήσεις χοληστερόλης. Η LDL-C ποικίλει ανάλογα με το φύλο, την ηλικία αλλά και την καταγωγή ενός ατόμου. Η υπερχοληστερολαιμία είναι παρούσα στους ασθενείς με FH συνήθως από τη γέννηση και οι περισσότεροι ετεροζυγώτες έχουν επίπεδα LDL-C πάνω από το 90^ο εκατοστημόριο της ηλικίας. Η διάγνωση γίνεται συνήθως χρησιμοποιώντας τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στην πρώτη μέτρηση και τα επίπεδα της LDL-C στη δεύτερη. Παρ' όλα αυτά τα επίπεδα της χοληστερόλης δεν είναι επαρκή για τη διάγνωση της FH καθώς πολλές φορές υπερκαλύπτουν αυτά ασθενών με μη κληρονομική υπερχοληστερολαιμία οδηγώντας έτσι σε λανθασμένα αρνητικά και λανθασμένα θετικά επίπεδα κατά 8-18% (Kwiterovich et al., 1974). Τα επίπεδα της HDL-C είναι συνήθως φυσιολογικά ή χαμηλά.

Σύμφωνα με το πρόγραμμα US MEDPED (Make Early Diagnosis to Prevent Early Death) για τη διάγνωση της FH με κριτήριο τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης (total cholesterol-TC), ανάλογα με την ηλικία και το βαθμό συγγένειας (1^{ου}, 2^{ου}, 3^{ου} βαθμού και πληθυσμό) θα πρέπει να λαμβάνονται και διαφορετικές ανώτερες τιμές TC (**Πίνακας 1.2**) (Williams et al., 1993). Τα οριακά επίπεδα της TC για την επίτευξη ειδικότητας 98% εξασφαλίζουν 88% ευαισθησία στη διάγνωση συγγενών πρώτου βαθμού και 54% για το γενικό πληθυσμό (**Πίνακας 1.2**) (Williams et al., 1993).

Πίνακας 1.2. Επίπεδα TC σε διεθνείς μονάδες (SI) (mmol/l) που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση FH με ειδικότητα 98%. Στην παρένθεση παρουσιάζονται οι συμβατικές μονάδες (CU) (mg/dL).

Ηλικία	Συγγενείς 1 ^{ου} βαθμού	Συγγενείς 2 ^{ου} βαθμού	Συγγενείς 3 ^{ου} βαθμού	Γενικός Πληθυσμός
<18	5.7 (220)	5.9 (225)	6.2 (240)	7.0 (270)
20	6.2 (240)	6.5 (250)	6.7 (255)	7.5 (290)
30	7.0 (270)	7.2 (275)	7.5 (290)	8.8 (340)
>40	7.5 (290)	7.8 (300)	8.0 (310)	9.3 (360)

1.9.2 Κλινική διάγνωση

Η διάγνωση της FH επιβεβαιώνεται και με επιπλέον κλινικά κριτήρια τα οποία συνοψίζονται στον **Πίνακα 1.3**. Συνήθως για τον εντοπισμό ετεροζυγωτών τα κριτήρια περιλαμβάνουν την παρουσία ξανθωμάτων, το οικογενειακό ιστορικό CAD και τα επίπεδα χοληστερόλης. Στην Ελλάδα η διάγνωση ετεροζυγωτών γίνεται σύμφωνα με το πρόγραμμα US MEDPED.

Όπως φαίνεται και από τον **Πίνακα 1.3**, σημαντικά κλινικά κριτήρια για τη διάγνωση ατόμων με FH αποτελούν τα επίπεδα TC και LDL-C και ο τρόπος κληρονομικότητας. Αυτά είναι και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό Simon Broome στη Μεγάλη Βρετανία (Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group 1991). Σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια οι περιπτώσεις FH χωρίζονται σε πιθανές και βέβαιες. Μια περίπτωση χαρακτηρίζεται βέβαιη όταν στον ασθενή είναι εμφανή ξανθώματα τένοντων. Συνήθως όμως τα ξανθώματα, σε ποσοστό 80%, εμφανίζονται κατά την τέταρτη δεκαετία ζωής. Αντίθετα μόνο το 7% των περιπτώσεων παρουσιάζει ξανθώματα σε ηλικία κάτω των 19, επομένως για την κλινική διάγνωση λαμβάνεται υπ' όψιν η συνύπαρξη άλλων κλινικών χαρακτηριστικών (Thomson et al., 1989).

Τα ξανθώματα οφείλονται στην εναπόθεση λιπιδίων (χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, φωσφολιπίδια) και κολλαγόνου (Vermeer et al., 1982) στο δέρμα και στους τένοντες. Εμφανίζονται κυρίως στους αγκώνες, στα βλέφαρα και στα γόνατα. Στο βολβό των ματιών μπορεί επίσης να παρατηρηθεί η μορφή ενός κίτρινου θολού δακτυλίου, γνωστού και ως γεροντότοξο.

Κριτήρια αποκλεισμού για τη διάγνωση της FH αποτελούν τα δευτερεύοντα χαρακτηριστικά υπερχοληστερολαιμίας (σακχαρώδης διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, οιστρογόνα, ηπατική νόσος) (Williams et al., 1993).

Σύμφωνα με το πρόγραμμα Dutch MEDPED, το οποίο δημιουργήθηκε στην

Ολλανδία, η διάγνωση γίνεται με κριτήρια όπου στο καθένα αντιστοιχούν πόντοι. Τα κριτήρια του Dutch MEDPED περιλαμβάνουν προσωπικά και οικογενειακά επίπεδα LDL-C, ιστορικό CAD και ύπαρξη γεροντότοξου και ξανθωμάτων πριν την ηλικία των 45 ετών (**Πίνακας 1.4**) (Defesche, 2000). Ακολουθώντας τα παραπάνω κριτήρια διάγνωσης, το 83% των ασθενών με βαθμολογία μεγαλύτερη από 8 έχουν μετάλλαξη στον *LDLR*. Το υπόλοιπο 17% των ασθενών πιθανόν να έχει μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια εκτός από του *LDLR*. Η κλινική εικόνα των ομοζυγωτών με FH είναι διαφορετική από αυτή των ετεροζυγωτών. Τα επίπεδα της LDL-C από τη γέννηση κυμαίνονται από 600-1200mg/dL. Τα ξανθώματα, το γεροντότοξο και η αθηροσκλήρυνση στους ομοζυγώτες παρουσιάζονται από την ηλικία των τεσσάρων ετών (Khachadurian et al., 1973).

Πίνακας 1.3. Κλινικά κριτήρια διάγνωσης της FH.

A. Κριτήρια διάγνωσης ετερόζυγων ατόμων με FH

	Ηλικία (χρόνια)			
	45	35	25	<18
1. Πολύ υψηλή TC (mg/dL)	>360	>340	>290	>270
2. Πολύ υψηλή LDL-C (mg/dL)	>260	>240	>220	>200
3. Απουσία δευτερευόντων αιτιών υπερχοληστερολαιμίας (διαβήτης, υποθυρεοειδισμός, οιστρογόνα, ηπατική νόσος)				
4. Τουλάχιστον ένας παιδιατρικός συγγενής (παιδί, εγγονός, ανιψιός) <18 χρονών με πολύ υψηλή TC >270mg/dL ή ένας ενήλικας συγγενής με ξανθώματα τενόντων.				
5. Επικρατής έκφραση στην οικογένεια				

B. Κριτήρια διάγνωσης των συγγενών των ατόμων με FH

		Ηλικία (χρόνια)			
	45	35	25	<18	
1. Υψηλή TC (mg/dL)	>290	>270	>240	>220	
ή υψηλή LDL-C (mg/dL)	>205	>190	>170	>155	
2. Απουσία δευτερευόντων αιτιών υπερχοληστερολαιμίας					

Πίνακας 1.4. Κριτήρια διάγνωσης της FH σύμφωνα με το πρόγραμμα Dutch MEDPED (Defesche, 2000).

Οικογενειακό Ιστορικό	Βαθμοί
1. Συγγενής πρώτου βαθμού με CAD	1
2. Συγγενής πρώτου βαθμού με LDL-C πάνω από το 95 ^ο εκατοστημόριο	1
3. Συγγενής πρώτου βαθμού με ξανθώματα ή γεροντότοξο	2
4. Παιδιατρικός συγγενής <18 χρονών με LDL-C πάνω από το 95 ^ο εκατοστημόριο	2
Προσωπικό Ιστορικό	
1. CAD	2
2. Πρόωρη περιφερική ή αγγειοεγκεφαλική νόσος	1
Σωματικά χαρακτηριστικά	
1. Ξανθώματα τενόντων	6
2. Γεροντότοξο (σε ηλικία άνω των 45 ετών)	4
Βιοχημική εξέταση (TG <200mg/dL, 2.3mmol/l)	
1. LDL-C >330mg/dL (8.5mmol/l)	8
2. LDL-C 250-329mg/dL (6.5-8.5mmol/l)	5
3. LDL-C 140-249mg/dL (4.9-6.5mmol/l)	3
4. LDL-C 150-189mg/dL (4.0-4.9mmol/l)	1
Ανάλυση DNA	
Μετάλλαξη στον <i>LDLR</i>	8
Διαγνωστική συνολική βαθμολογία: βέβαιη: > 8, δυνατή: 6-7, πιθανή: 3-5	

1.9.3 Γενετική διάγνωση

Η γενετική ανάλυση αποτελεί χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στην FH, εξετάζοντας την κληρονομηση μίας συγκεκριμένης μετάλλαξης. Παρά τα υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και θνησιμότητας που οφείλονται στη FH η διάγνωση της ασθένειας στον πληθυσμό με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά δεν είναι επαρκής (Πίνακας 1.5).

Σε περίπτωση που τα επίπεδα λιπιδίων είναι γνωστά σε μια οικογένεια και η κλινική εικόνα επαρκής, η διάγνωση ενός ετεροζυγώτη με FH είναι απλή. Ωστόσο, εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο το οικογενειακό ιστορικό, η διάγνωση είναι πιο δύσκολη. Επιπλέον, ένα από τα προβλήματα που προκύπτει από τη διάγνωση της FH με κριτήριο την υπερλιπιδαιμία είναι ότι συχνά τα επίπεδα λιπιδίων στους ετεροζυγώτες υπερκαλύπτουν αυτά του γενικού πληθυσμού. Έτσι, σε 5-10% των παιδιών και σε 15-20% των συγγενών με FH γίνεται λάθος διάγνωση (Humphries et al., 1997).

Μέχρι σήμερα οποιαδήποτε τεχνική μοριακής γενετικής κι αν χρησιμοποιηθεί,

δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν όλες οι μεταλλάξεις. Αυτό οφείλεται αφενός στην έλλειψη υψηλής ευαισθησίας των μεθόδων και αφετέρου στο ότι δεν αναλύονται όλα τα τμήματα του *LDLR* και *ApoB*. Επιπλέον, πολλοί ασθενείς χαρακτηρίζονται ως FH, μετά από κλινική διάγνωση βασισμένη στα επίπεδα λιπιδίων, στην πραγματικότητα όμως η υπερλιπιδαιμία που παρατηρείται σε αυτούς δεν είναι μονογενής. Ως επακόλουθο, η ανάλυση των γονιδίων *LDLR* και *ApoB* σε αυτά τα άτομα δεν οδηγεί σε εύρεση μετάλλαξης.

Η γενετική διάγνωση είναι σχετικά εύκολη σε χώρες όπου οι μεταλλάξεις που την προκαλούν είναι περιορισμένες, δηλαδή έχουν ομοιογενή πληθυσμό. Ιδιαίτερα όταν σε μια οικογένεια η μετάλλαξη που προκαλεί τη νόσο είναι γνωστή η μοριακή γενετική μπορεί να προσφέρει βέβαιη διάγνωση.

Πίνακας 1.5. Η FH ως παγκόσμιο πρόβλημα υγείας.

10,000,000 ασθενείς παγκοσμίως
200,000 ασθενείς πεθαίνουν ετησίως από CAD που θα μπορούσε να είχε προληφθεί
80% των ασθενών δεν έχουν διαγνωσθεί
84% των ασθενών δεν ακολουθούν υπολιπιδαιμική αγωγή

1.10 Μέθοδοι γενετικής ανάλυσης

Οι μέθοδοι για την ανίχνευση μεταλλάξεων κατατάσσονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες (1) Σάρωσης: μεγάλα τμήματα DNA ελέγχονται για άγνωστες μεταλλάξεις και (2) Διάγνωσης: συγκεκριμένα τεστ σχεδιάζονται για τον έλεγχο ύπαρξης γνωστών μεταλλάξεων. Η σάρωση για άγνωστες μεταλλάξεις που προκαλούν FH, γίνεται με DGGE, ανάλυση πολυμορφισμών διαμόρφωσης του ενός κλώνου (Single-Strand Conformation Polymorphism-SSCP), υψηλής επίδοσης υγρή χρωματογραφία αποδιάταξης (Denaturing High Performance Liquid Chromatography-DHPLC) (Bertolini et al., 2000, Bunn et al., 2002, Graham et al., 1999, Heath et al., 2001a, Lombardi et al., 2000, Mozas et al., 2000, Nissen et al., 1996), καθώς και ανάγνωση της πρωτοδιάταξης (sequencing) των προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) (Hobbs et al., 1992, Leitersdorf et al., 1989). Για την ανίχνευση μεταλλάξεων σε κάποιους πληθυσμούς χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι δοκιμής πρόσδεσης ολιγονουκλεοτιδίων (oligonucleotide ligation assay-OLA) (Baron et al., 1996), ολιγονουκλεοτιδίων συγκεκριμένων αλληλομόρφων (Allele-Specific Oligonucleotides-ASO) (Miltiadous et

al., 2001) και πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Traeger-Synodinos et al., 1998).

Εάν με την εφαρμογή ενός εκ των προηγούμενων μεθόδων δεν ανιχνευθεί μετάλλαξη σημείου ή μικρή ανακατάταξη (έλλειψη ή ένθεση), εφαρμόζεται ανάλυση υβριδοποίησης Southern (Southern blot), ή PCR μεγάλων τμημάτων (Long PCR) για την ανίχνευση μεγάλων ανακατατάξεων (Bochmann et al., 1996). Η μέθοδος Southern blot είναι χρονοβόρα κι απαιτεί μεγάλες ποσότητες DNA, ενώ και η Long PCR έχει μειονεκτήματα. Εάν η μετάλλαξη δεν βρίσκεται μεταξύ των ορίων των εκκινητών, το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη δεν θα πολλαπλασιαστεί, και τα αποτελέσματα θα παρουσιάζουν ομοζυγωτία για το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Με μεθόδους ποσοτικής PCR (Quantitative PCR) όπως είναι η Real-Time και η σύνδεση πολλαπλών ανιχνευτών (Multiplex Ligation-dependent Probe Assay-MLPA) είναι δυνατόν να συγκριθεί η ποσότητα των αλληλομόρφων μεταξύ ασθενών και μαρτύρων, ανεξάρτητα από το μέγεθος της ανακατάταξης (Damgaard et al., 2005). Η DHPLC είναι επίσης πιο ευαίσθητη μέθοδος από την SSCP (Bunn et al., 2002), καθώς το 36% των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται με την dHPLC δεν ανιχνεύονται από την SSCP. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση ποικίλλουν από 96-100%.

Το ερώτημα που προκύπτει όταν βρεθεί μια άγνωστη μετάλλαξη στον *LDLR* είναι εάν είναι αυτή το αίτιο της νόσου. Η διαφοροποίηση μεταξύ πολυμορφισμών και μεταλλάξεων δεν είναι πάντα εμφανής και στις περισσότερες περιπτώσεις χρειάζεται να γίνουν επιπλέον πειράματα έκφρασης για να επιβεβαιωθεί ή λειτουργικότητα του LDL-R. Οι μεγάλες και οι ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που οδηγούν σε έκφραση ημιτελών (truncated) πρωτεϊνών είναι συνήθως υπαίτιες για την εμφάνιση της νόσου, αντίθετα η παθογένεια των παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων είναι συχνά αβέβαιη. Επιπλέον, η εύρεση νέων μεταλλάξεων στον υποκινητή, στα όρια εσονίων-εξονίων και στη μη μεταφραζόμενη 3'-περιοχή, πρέπει να αξιολογούνται απαραίτητα με πειράματα έκφρασης (Jensen et al., 1996a, Jensen et al., 1996b).

1.11 Θεραπεία για την FH

1.11.1 Διαιτητική Αγωγή

Η χοληστερόλη της τροφής προσλαμβάνεται με τη μορφή των χυλομικρών και η απομάκρυνσή της από το πλάσμα γίνεται από το ήπαρ. Περίπου το 40% απορροφάται ενώ το 60% αποβάλλεται μέσω των κοπράνων. Η διαιτητική χοληστερόλη συμβάλλει στο συνολικό ποσό της ηπατοκυτταρικής χοληστερόλης και μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση χοληστερόλης και των LDL-Rs στο σώμα. Αύξηση της ηπατικής χοληστερόλης μειώνει τον αριθμό των LDL-Rs και επομένως αυξάνει

την LDL στο πλάσμα. Η αύξηση της διαιτητικής χοληστερόλης προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση της LDL-C στα άτομα με FH σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα (Connor et al., 1990).

Το είδος των λιπαρών οξέων και το περιεχόμενο των τροφίμων σε χοληστερόλη παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή της δίαιτας για τη θεραπεία της FH. Τα κορεσμένα λίπη μειώνουν την ηπατική έκφραση του *LDLR* και αυξάνουν τη σύνθεση της VLDL. Το πιο δραστικό κορεσμένο οξύ σε αυτή την περίπτωση είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0), όμως και το λαυρικό (C12:0) και το μυριστικό (C14:0) μπορούν να μειώσουν τους LDL-Rs. Τα μονοακόρεστα λίπη βρίσκονται σε έλαια φυτικής και ζωικής προέλευσης. Η επίδρασή τους στα επίπεδα της LDL-C πιστεύεται ότι είναι ουδέτερη (Grundey et al., 1990). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και είναι πρόδρομοι των προσταγλαδινών. Διακρίνονται σε ω-6 και ω-3 και προσλαμβάνονται από την τροφή. Τα ω-6 λιπαρά οξέα μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα χοληστερόλης καθώς αυξάνουν τη δραστηριότητα των LDL-R ενώ σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να μειώσουν την HDL-C (Grundey et al., 1990). Για το λόγο αυτό η πρόσληψή τους δεν πρέπει να περνά το 6% της προσλαμβανόμενης ενέργειας. Η κύρια δράση των ω-3 είναι η μείωση των τριγλυκεριδίων μέσω της μείωσης της VLDL (Goodnight et al., 1982).

Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι οι φυτικές στερόλες και στανόλες έχουν ευεργετική δράση στην μείωση της LDL-C μειώνοντας την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης (Cleghorn et al., 2003). Οι φυτικές στερόλες, όπως η σιτοστερόλη και η καμπεστανόλη, απορροφούνται ελάχιστα (<10%) και τα επίπεδα στο πλάσμα ρυθμίζονται από την εντερική απορρόφηση και την χολική έκκριση (Ling et al., 1995, Kris-Etherton et al., 2002). Η χορήγηση φυτικών στερολών και στανολών σε παιδιά με FH μείωσε την LDL-C κατά 10-15% (Amudsen et al., 2002, Gylling et al., 1995). Τα επίπεδα στερολών και στανολών στο πλάσμα ασθενών με FH είναι υψηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα σε μάρτυρες (Ketomaki et al., 2003) και συνεχίζουν να αυξάνουν κατά τη διάρκεια της θεραπείας με στατίνη (Miettinen et al., 2003).

Σε άτομα υψηλού κινδύνου όπως οι είναι ασθενείς με FH ακολουθείται η δίαιτα που βασίζεται σε “θεραπευτικές αλλαγές τρόπου ζωής” (Therapeutic Lifestyle Changes-TLC). Η δίαιτα αυτή συνιστάται από τον Μάιο του 2001 όταν μέσω του NCEP δημοσιοποιήθηκαν οι νέες οδηγίες για την αντιμετώπιση των υψηλών επιπέδων χοληστερόλης, στο Πλαίσιο Θεραπείας Ενηλίκων III (Adult Treatment Panel III-ATP III). Η δίαιτα αυτή, εμπλουτισμένη με φυτικές στερόλες και στανόλες, έχει τις κατάλληλες συστάσεις θρεπτικών συστατικών και μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους ασθενείς με FH ακόμη και σε παιδιά πάνω από 2 ετών (**Πίνακας 1.6**). Σε

συνδυασμό με τη διαίτα συνιστάται τουλάχιστον μέτρια φυσική δραστηριότητα για την κατανάλωση 200 θερμίδων ανά ημέρα.

Διαφορές στα επίπεδα λιπιδίων παρατηρούνται και ανάμεσα σε ασθενείς που φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Η σημασία των διατροφικών παραγόντων στην FH επιβεβαιώθηκε από τη μελέτη των Pimstone et al., κατά την οποία συγκρίθηκαν τα επίπεδα λιπιδίων και η εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου σε Κινέζους που ζούσαν στην Κίνα και στον Καναδά (Pimstone et al., 1998). Μεγαλύτερα επίπεδα LDL-C παρατηρήθηκαν στους ετεροζυγώτες με FH που ζούσαν στον Καναδά σε σχέση με αυτούς που ζούσαν στην Κίνα. Αυτές οι διαφορές αποδόθηκαν εν μέρει στα διαφορετικά επίπεδα άσκησης αλλά πολύ περισσότερο στις διατροφικές συνήθειες. Παρ' ότι η διαίτα στους ασθενείς με FH δεν είναι επαρκές μέσο για τη θεραπεία, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε κάθε αγωγή. Ο κύριος στόχος της διαίτας είναι η μείωση της LDL-C. Υπολογίζεται ότι η διατροφή που αποτελείται από λαχανικά, φρούτα, όσπρια, ψάρι, γαλακτοκομικά χωρίς λιπαρά, 100mg ανά ημέρα σε χοληστερόλη, 20% θερμίδες από λίπος και 6% από κορεσμένα λιπαρά οξέα, μπορεί να μειώσει την LDL-C του πλάσματος κατά 18-21% στους ετεροζυγώτες (Hopkins et al., 2003).

Πίνακας 1.6. Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη θρεπτικών συστατικών διαίτας για ασθενείς με FH.

Θρεπτικό Συστατικό	Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη
Κορεσμένα Λίπη	<7% συνολικών θερμίδων
Πολυακόρεστα Λίπη	≤10% συνολικών θερμίδων
Μονοακόρεστα Λίπη	≤20% συνολικών θερμίδων
Ολικό Λίπος	25-35% συνολικών θερμίδων
Υδατάνθρακες	50-60% συνολικών θερμίδων
Φυτικές Ίνες	20-30g
Πρωτεΐνες	15% συνολικών θερμίδων
Χοληστερόλη	≤200mg
Συνολικές Θερμίδες	Για τη διατήρηση του σωματικού βάρους
Φυτικές στερόλες/στανόλες	1.5-2.5g

1.11.2 Φαρμακευτική αγωγή

Ο κύριος στόχος της φαρμακευτικής αγωγής που εφαρμόζεται σε ασθενείς FH είναι η μείωση των επιπέδων της LDL-C, και δευτερεύον στόχος η αύξηση της HDL-

C. Σύμφωνα με το ATP III, το επιθυμητό αποτέλεσμα της θεραπείας είναι η μείωση της LDL-C σε $<130\text{-}160\text{mg/dL}$ ($<3.4\text{-}4.1\text{mmol/L}$) σε άτομα που δεν έχουν εμφανίσει καρδιακά προβλήματα και σε $<100\text{mg/dL}$ ($<2.6\text{mmol/L}$) σε άτομα που έχουν εμφανίσει (Illingworth et al., 1993). Πρόσφατα έγινε μια αναθεώρηση του ATP III, από το NCEP (Grundy et al., 2004), βασισμένη σε μελέτες όπου έγινε χρήση στατινών για την μείωση της LDL-C. Οι οδηγίες δεν προτείνουν αλλαγή των θεραπευτικών στόχων για την LDL-C, αλλά πιο εντατικές θεραπείες για την μείωση της LDL-C. Δύο είναι οι προτάσεις (1) LDL-C $<100\text{mg/dL}$ ($<2.6\text{mmol/L}$) για ασθενείς που δεν έχουν εμφανίσει καρδιακά προβλήματα και (2) $<70\text{mg/dL}$ ($<1.8\text{mmol/L}$) γι' αυτούς που ανήκουν σε ομάδα πολύ υψηλού κινδύνου. Χαρακτηριστικά των ασθενών που ανήκουν στην ομάδα πολύ υψηλού κινδύνου είναι η ύπαρξη CAD και ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω (1) διαβήτης (2) άλλες μορφές καρδιαγγειακής νόσου (πχ. αθηροσκλήρυνση καρωτίδας) (3) κάπνισμα (4) μεταβολικό σύνδρομο (5) έμφραγμα μυοκαρδίου τα τελευταία 2 χρόνια. Κάποια από τα παραπάνω δεν ισχύουν για τους ασθενείς με FH καθώς αποκλείονται κατά την διάγνωση της νόσου πχ. σακχαρώδης διαβήτης, μεταβολικό σύνδρομο.

Τα φάρμακα που κυρίως χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ασθενών με FH είναι οι στατίνες, οι ρητίνες (resins ή bile acid sequestrants) και το νικοτινικό οξύ. Από αυτά τα πιο αποτελεσματικά είναι οι στατίνες.

Οι στατίνες είναι αναστολείς της HMG-CoA αναγωγής και έχουν τα πιο δραστικά αποτελέσματα στη μείωση της LDL-C (**Πίνακας 1.7**). Η αναστολή της HMG-CoA αναγωγής έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ηπατικής σύνθεσης της LDL και την αύξηση της σύνθεσης της HMG-CoA αναγωγής και των LDL-R. Οι στατίνες επίσης μειώνουν την παραγωγή της VLDL και αυτό εξηγεί και τη μείωση που προκαλούν στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων (Isusi et al., 2000, Funatsu et al., 2001). Τα φάρμακα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η λοβαστατίνη, η φλουβαστατίνη, η σιμβαστατίνη, η προβαστατίνη, η ατορβαστατίνη και η ροσουβαστατίνη. Η δράση των στατινών έχει επιβεβαιωθεί σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα LDL-C. Επίσης, η δράση της πραβαστατίνης (Gaddi et al., 1991, Knipscheer et al., 1996), της λοβαστατίνης (Stein et al., 1999), της φλουβαστατίνης (Koizumi et al., 1995), της σιμβαστατίνης (de Sauvage Nolting et al., 2002), της ατορβαστατίνης (Marais et al., 1997) και της ροσουβαστατίνης (Stein et al., 1999, Lind et al., 2004) έχει επιβεβαιωθεί και σε ετεροζυγώτες ασθενείς με FH.

Παρά τη αποτελεσματικότητα των στατινών κάποιοι ασθενείς δεν φτάνουν τα επιθυμητά επίπεδα LDL-C. Σε μια μελέτη από τους Wierzbicki et al., το 77% και το 90% των ετεροζυγωτών με FH που έπαιρναν ατορβαστατίνη και σιμβαστατίνη αντίστοιχα δεν έφτασαν τα 135mg/dL για την LDL-C. Η συνδυαστική θεραπεία

πιθανόν να έχει καλύτερα αποτελέσματα σε αυτές τις περιπτώσεις (Wierzbicki et al, 1999).

Ακόμη ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την αξιολόγηση των στατινών είναι η εκτίμηση της μακροχρόνιας αποτελεσματικότητάς τους. Κάποιες έρευνες έχουν δείξει μείωση της αποτελεσματικότητάς τους λίγο μετά από την έναρξη της θεραπείας ή μετά από μακροχρόνια χρήση (Fieseler et al., 1991, Simons et al., 1992).

Οι πιο συνηθισμένες παρενέργειες των στατινών είναι η ηπατοτοξικότητα και οι ανωμαλίες στη λειτουργία των σκελετικών μυών. Η μυοπάθεια και η ραβδομύωση χαρακτηρίζονται από μυϊκό πόνο και αδυναμία και σχετίζονται με τα επίπεδα της κινάσης της κρεατίνης που περνούν τα φυσιολογικά κατά 10 φορές. Η μυοπάθεια έχει συχνότητα 1:1,000 και εξαρτάται από τη δόση της στατίνης που χορηγείται. Οι προτεινόμενες δόσεις είναι: 10mg ατορβαστατίνης, 20mg σιμβαστατίνης, 40mg λοβαστατίνης, 40mg πραβαστατίνης και 40mg φλουβαστατίνης. Η δραστηριότητα των στατινών εμφανίζει μεγάλη ποικιλοότητα ανάμεσα στους ασθενείς με FH γεγονός που αποδεικνύει επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες.

Πίνακας 1.7. Συγκριτικά αποτελέσματα δράσης φαρμάκων για τη μείωση των λιπιδίων σε ετεροζυγώτες ασθενείς με FH (Πηγή Report of a WHO consultation).

Φάρμακευτική Αγωγή	Μείωση LDL-C (%)
Στατίνες	20-55
Νικοτινικό Οξύ	15-30
Ρητίνες	15-30

Για την επίτευξη των επιθυμητών επιπέδων LDL-C πολλές φορές χρειάζεται εφαρμογή συνδυαστικής θεραπείας. Ο συνδυασμός στατινών με ρητίνες ή ezetimibe είναι η πρώτη επιλογή όταν στόχος είναι η μείωση της LDL-C κατά 50% (Davidson 2002).

Οι ρητίνες είναι αρκετά αποτελεσματικές για τη μείωση της LDL-C και έχουν δοκιμαστεί σε πολλές κλινικές μελέτες. Οι ρητίνες εμποδίζουν την απορρόφηση των χολικών οξέων. Η μεγάλη έκκριση χολικών οξέων οδηγεί σε μετατροπή της χοληστερόλης σε χολικά άλατα, σε μείωση της ηπατικής χοληστερόλης και αύξηση των LDL-Rs (Shepherd, 1989). Η χορήγηση ρητινών μειώνει την LDL-C κατά 15-30%

σε ετεροζυγώτες με FH αλλά οι παρενέργειες σε πολλές περιπτώσεις περιορίζουν τη χρήση τους (Insull et al., 1991, Hunninghake et al., 1995, Pravastatin Multicenter Study Group, 1993). Παρ' όλα, αυτά καινούριες ρητίνες χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική μονοθεραπεία και συνιστώνται αντί για στατίνες, ειδικά στα παιδιά και στις γυναίκες. Ο συνδυασμός δε στατίνης και ρητίνης μπορεί να μειώσει την LDL-C έως και 50%. (Illingworth, 1989). Οι ρητίνες δεν χορηγούνται σε ασθενείς με χαρακτηρισμένη καρδιαγγειακή νόσο που ακολουθούν παράλληλα και άλλη θεραπεία γιατί επηρεάζουν την απορρόφηση των φαρμάκων (Durrington, 1995).

Το ezetimibe είναι ένα νέο φάρμακο που εμποδίζει την εντερική απορρόφηση της χοληστερόλης παρεμποδίζοντας τη μεταφορά της στο εντερικό τοίχωμα (Sudhop et al., 2002). Ως μονοθεραπεία, μειώνει την LDL-C κατά μέσο όρο 20% (Dujovne et al., 2002, Harris et al., 2003, Knopp et al., 2003). Ο συνδυασμός του (10mg) με στατίνη οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της LDL-C κατά 14-25% (Davidson et al., 2002, Gagne et al., 2002). Σε ομοζυγώτες FH που έκαναν LDL-αφαίρεση κάθε 2 εβδομάδες και έπαιρναν σιμβαστατίνη ή ατορβαστατίνη, η χορήγηση 10mg ezetimibe μείωσε την χοληστερόλη επιπλέον, κατά 9% μέσα σε 4 εβδομάδες (Yamamoto et al., 2005)

1.11.3 Άλλες θεραπευτικές επιλογές

Οι ομοζυγώτες με FH δεν ανταποκρίνονται επαρκώς στην θεραπεία που εφαρμόζεται στους ετεροζυγώτες (δίαιτα-φαρμακευτική αγωγή) καθώς παράγουν ελάχιστους λειτουργικούς LDL-R. Για τους ασθενείς αυτούς εφαρμόζεται πλασμαφαίρεση και LDL αφαίρεση. Η πλασμαφαίρεση εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1975 σε ομοζυγώτες με FH (Thomson et al., 1975). Το πλάσμα απομακρύνεται με συνεχόμενη ροή και εισέρχεται ξανά αφού έχουν αφαιρεθεί η LDL, ILDL, VLDL και HDL. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μειώνει και την HDL-C, αναφέρεται όμως ότι τα επίπεδα της επανέρχονται μέσα σε μια εβδομάδα (Thomson et al., 1985). Η LDL-C σε ασθενείς που έκαναν πλασμαφαίρεση και έπαιρναν νικοτινικό οξύ, μειώθηκε κατά 50% (Postglione et al., 1985).

Μελέτη 6 χρόνων έδειξε ότι η μείωση στην LDL-C ήταν μεγαλύτερη σε εκείνους που ακολούθησαν θεραπεία πλασμαφαίρεσης σε σχέση με εκείνους που ακολουθούσαν φαρμακευτική αγωγή (-58 vs. -28%) (Honuiri FH LDL Apheresis Group et al., 1998). Επιπλέον, τα καρδιακά επεισόδια ήταν κατά 72% χαμηλότερα στην ομάδα της πλασμαφαίρεσης σε σχέση της φαρμακευτικής αγωγής.

Η LDL αφαίρεση δεν μειώνει την HDL-C αλλά με ειδικές στήλες (dextran sulfate cellulose) απομακρύνονται μόνο οι λιποπρωτεΐνες που περιέχουν Apo-B, (Bambauer et al., 1997, Fadul et al., 1997).

Και με τις δυο μεθόδους μειώνονται τα επίπεδα της TC κατά 60-70%, της

LDL-C κατά 70-80%, της VLDL-C κατά 65-75% και της λιποπρωτεΐνης α κατά 60-70% (Gordon et al., 1994, Lane et al., 1995). Με τη διακοπή της διαδικασίας τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών αυξάνονται και πάλι. Η συχνότητα της θεραπείας υπολογίζεται ώστε οι συγκεντρώσεις των λιποπρωτεϊνών να παραμένουν στα επιθυμητά επίπεδα. Η αφαίρεση LDL από το πλάσμα επαναλαμβάνεται κάθε 1-2 εβδομάδες και η πλασμαφαίρεση 2 φορές την εβδομάδα και διαρκεί περίπου 3 ώρες. Η πιο συχνή παρενέργεια είναι η υπόταση που εμφανίζεται στο 3% των ασθενών που έχουν υποστεί πλασμαφαίρεση (Seidel, 1996).

Η μεταμόσχευση ήπατος αποτελεί θεραπεία σε ομοζυγώτες FH που δεν παράγουν λειτουργικούς LDL-R (Bilheimer, 1989) και δεν ανταποκρίνονται σε άλλα είδη θεραπείας. Η πρώτη μεταμόσχευση ήπατος έγινε το 1983 σε ένα κορίτσι 6 ετών ομόζυγο για FH (Starzl et al., 1984). Λόγω της προχωρημένης καρδιαγγειακής νόσου και των επανειλημμένων εμφραγματικών επεισοδίων συγχρόνως έγινε και μεταμόσχευση καρδιάς. Τα επίπεδα LDL-C μειώθηκαν κατά 81%, ο καταβολισμός της χοληστερόλης αυξήθηκε κατά 2.5 φορές και τα ξανθώματα άρχισαν να υποχωρούν (Starzl et al., 1984). Η μεταμόσχευση ήπατος μειώνει κατά πολύ την LDL-C, όμως παράλληλα, όπως έγινε και στην παραπάνω περίπτωση, πρέπει να χορηγείται ανοσοκατασταλτική αγωγή.

1.12 Άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της CAD

Η επίδραση των μεταλλάξεων του *LDLR* στην λειτουργικότητα των υποδοχέων χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλιότητα. Συνακόλουθα, λόγω της ύπαρξης διαφορετικών μεταλλάξεων, ποικίλει και η διαμόρφωση του λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών με FH αλλά και η συχνότητα εμφάνισης CAD. Ο φαινότυπος της FH ενώ σε μεγάλο ποσοστό οφείλεται στον τύπο της μετάλλαξης του *LDLR*, φαίνεται να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, περιβαλλοντικούς ή γενετικούς (Wittekoek et al., 1998, Pimstone et al., 1998, Wittekoek et al., 1999, Bertolini et al., 2004).

Το γονίδιο της *ApoE* βρίσκεται στη θέση 19q13.2 και είναι ένα από τα πιο ευρέως μελετημένα στους ασθενείς με FH. Η Apo-E παίζει ρόλο στο μεταβολισμό καθώς συμμετέχει στην εξάλειψη των λιποπρωτεϊνών που είναι πλούσιες σε τριγλυκερίδια. Αποτελεί συνδετικό μόριο (ligand) για διάφορους υποδοχείς συμπεριλαμβανομένου και του LDL-R. Δομικά “λάθη” στην Apo-E οδηγούν σε εξασθενημένη αλληλεπίδραση των λιποπρωτεϊνών, που περιέχουν Apo-E, με τους υποδοχείς και οδηγούν σε δισλιπιδαιμία, αθηρογένεση και πρόωρη CAD (Brewer et al., 1983).

Η *ApoE* έχει 3 ισομορφές: E2, E3, E4 που προκύπτουν από δύο πολυμορφισμούς στις θέσεις 2059(T/C) ή 112 (Cys/Arg) και 2197(C/T) ή 158 (Arg/Cys). Οι απλότυποι που αντιστοιχούν σε κάθε ισομορφή είναι Cys₁₁₂/Arg₁₅₈ για την E3, Cys₁₁₂/1Cys₁₅₈ για την E2 και Arg₁₁₂/Arg₁₅₈ για την E4.

Η E2 είναι λειτουργικά αδρανής και σχετίζεται με CAD κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Brewer et al., 1983). Σε σύγκριση με την E3 ή E4 ισομορφή έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης και αυξημένο κίνδυνο CAD, στο γενικό πληθυσμό (Davignon et al., 1988, Hallman et al., 1991, Cumming et al., 1984, Wilson et al., 1994). Η επίδραση του γονότυπου *ApoE* στα επίπεδα λιπιδίων και την εμφάνιση CAD σε ασθενείς με FH έχει εκτιμηθεί από πολλές μελέτες, όμως τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα (Ferrieres et al., 1995, Vuorio et al., 1997, Carmena- Ramon et al., 2000, Bertolini et al., 2000, Lambert et al., 2001, Mozas et al., 2003, Bertolini et al., 2004).

Η οικογένεια των παραοξονασών (paraoxonase-PON) αποτελείται από 3 μέλη: PON 1, PON-2 και PON 3 τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα 7 στη θέση 7q21.3-22.1 (Primo-Parma et al., 2004). Σε αντίθεση με το PON 1, που εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, το PON-2 εκφράζεται σχεδόν παντού (Primo-Parma et al., 2004, Mochizuki et al., 1998). Το PON-2 έχει την ικανότητα να μειώνει το οξειδωτικό στρες και να προστατεύει από την οξείδωση της LDL-C. Τα κύτταρα που έχουν αυξημένη έκφραση του PON-2 παρουσιάζουν λιγότερο οξειδωτικό στρες (Ng et al. 2001). Προηγούμενες μελέτες έχουν συσχετίσει τον πολυμορφισμό Ser311Cys στο PON-2 με τα επίπεδα TC, LDL-C και Apo-B (Leus et al., 2001).

Η PON υδρολύει το παρανιτροφαινυλο-δισουλφοφορικό οξύ (Paraoxon-PO) το οποίο απενεργοποιεί την LPL. Η LPL παίζει ρόλο στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων από τα χυλομικρά και την VLDL. Το γονίδιο της LPL βρίσκεται στη θέση 8p22. Η ώριμη πρωτεΐνη αποτελείται από 448 αμινοξέα και για την έκφραση του ενζύμου απαιτείται η δημιουργία ομοδιμερούς συμπλέγματος (Fisher et al., 1997). Διάφοροι πολυμορφισμοί στην LPL μεταξύ των οποίων οι D9N, N291S, S447X έχουν μελετηθεί για την επίδρασή τους στον φαινότυπο της FH (Wittekoek et al., 1999, Bertolini et al., 2004).

Ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1-PAI-1) είναι ο πρωταρχικός αναστολέας του PA και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης. Έχει αναφερθεί ότι ο PAI-1 εμπλέκεται στην CAD καθώς οδηγεί σε εξασθενημένη ινωδόλυση (Juhan-Vague et al., 1993). Δέκα πολυμορφισμοί στο γονίδιο PAI-1 έχουν αναφερθεί μεταξύ των οποίων και η αντικατάσταση T σε G στη θέση +11053 της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής. Παρά το ότι το PAI εμπλέκεται στη εξέλιξη της CAD ο πολυμορφισμός δεν

έχει μελετηθεί σε ασθενείς με FH .

Ένα άλλο γονίδιο μεγάλου ενδιαφέροντος είναι το ινωδογόνο (fibrinogen). Το προϊόν αυτού και πιο συγκεκριμένα το ινώδες αποτελούν μόρια που πυροδοτούν την ινωδολυτική διεργασία, ενώ η μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες αποτελεί το τελευταίο στάδιο της διεργασίας της πήξης. Τα αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο CAD (de Maat et al., 1998) και το 50% των επιπέδων του στο πλάσμα οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες. Πολλοί πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί στα γονίδια που κωδικοποιούν τις 3 αλυσίδες του ινωδογόνου, α, β, και γ και βρίσκονται στο χρωμόσωμα 4. Παρ' όλα αυτά επειδή η μελέτη της σύνθεσης β-αλυσίδας είναι περιορισμένη, οι περισσότερες έρευνες επικεντρώνονται σε αυτό το γονίδιο. Από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της β-αλυσίδας (FGB) ο -455G/A έχει μελετηθεί περισσότερο από όλους στις κλινικές μελέτες. Ο πολυμορφισμός δεν έχει συσχετιστεί με τα επίπεδα λιπιδίων άμεσα, αλλά έμμεσα μέσω της συσχέτισης με το ινωδογόνο τα επίπεδα του τελευταίου σχετίζονται με των λιπιδίων (Lam et al., 1999).

Το μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide-NO), προϊόν του ενδοθηλίου, συμμετέχει στην διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του και έχει αντιθρομβωτική δράση. Συμμετέχει στην εκκαθάριση των ROS και εμποδίζει τη συσσωμάτωση, την ενεργοποίηση και την συγκόλληση των αιμοπεταλίων (Loscalzo et al., 1995). Το NO παράγεται από την συνθετάση του NO (NOS). Στα θηλαστικά υπάρχουν 3 ισομορφές της NOS (Schmidt et al., 1991). Αρκετοί πολυμορφισμοί υπάρχουν στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη NOS 3. Ο A-922G δεν έχει μελετηθεί αρκετά και είναι πολύ πιθανό να επηρεάζει τον φαινότυπο της FH καθώς η μη φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου είναι χαρακτηριστικό της υπερχοληστερολαιμίας (Nakayama et al., 1999).

Το κοιλιακό νατριουρητικό πεπτίδιο (Atrial Natriuretic Polypeptide-ANP) είναι η πρόδρομη μορφή της πρωτεΐνης που ονομάζεται απομονωμένο κοιλιακό αμυλοειδές (isolated atrial amyloid-IAA) (Takahashi et al., 1998). Από προηγούμενες αναφορές φαίνεται ότι το κοιλιακό K νατριουρητικό πεπτίδιο (atrial K-natriuretic peptide K-hANP) του πλάσματος έχει προστατευτικό ρόλο κατά της συνάθροισης του αμυλοειδούς (Maioli et al., 2001). Παρά το ότι ο ρόλος και η κλινική σημασία του IAA δεν είναι ακριβείς, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα ANP πιθανόν να σχετίζονται με αυξημένα καρδιακά επεισόδια. Πρόσφατα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η HDL δρα προστατευτικά κατά της αμυλοείδωσης, εμποδίζοντας ή μειώνοντας τη δημιουργία ινιδίων αμυλοειδούς (Maioli et al., 2001).

Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν βρεθεί στο γονίδιο ANP, και οι πιο μελετημένοι σχετίζονται με την υπέρταση που προκύπτει από ακατάλληλη διατροφή (Rutledge et al., 1995, Kato et al., 2000). Ένας από αυτούς είναι και ο T2238C που έχει

συσχετιστεί και με έμφραγμα του μυοκαρδίου (Kato et al., 2000). Η απαλοιφή του σημείου αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση *Sca I* στο γονίδιο του πρόδρομου ANP λόγω της αλλαγής T>C στο κωδικόνιο λήξης οδηγεί σε επιμηκυσμένη μορφή του ANP, δηλαδή το πεπτίδιο των 28 αμινοξέων αυξάνεται σε 30 αμινοξέα με την προσθήκη δύο μορίων αργινίνης. Ένας άλλος πολυμορφισμός στο εξόνιο 1 G664A οδηγεί σε αντικατάσταση βαλίνης από μεθειονίνη στη θέση 7 (Haluska et al., 1999).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Διάγνωση FH

Η διάγνωση ασθενών με FH πραγματοποιήθηκε από καρδιολόγους του Λιπιδαιμικού τμήματος της Καρδιολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου νοσοκομείου. Τα κριτήρια επιλογής των ατόμων ήταν τα υψηλά επίπεδα TC ($>360\text{mg/dL}$) και LDL-C ($>200\text{mg/dL}$) και τα φυσιολογικά επίπεδα τριγλυκεριδίων (triglycerides-TG) ($<175\text{mg/dL}$). Τα δευτερογενή αίτια υπερχοληστερολαιμίας (υποθυρεοειδισμός, σακχαρώδης διαβήτης, ηπατική ή νεφρική ανεπάρκεια) αποτέλεσαν αίτια αποκλεισμού. Στο οικογενειακό ιστορικό όλων των ασθενών υπήρχαν περιστατικά στεφανιαίας νόσου και υπερχοληστερολαιμίας, και σε συγγενείς πρώτου ή δεύτερου βαθμού τουλάχιστον ένα περιστατικό υπερχοληστερολαιμίας ή ξανθωμάτων. Ως ύπαρξη CAD στους ασθενείς ορίστηκε η υποβολή σε αγγειοπλαστική (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty-PTCA), η αορτοστεφανιαία παράκαμψη (coronary bypass surgery-CBS) καθώς και το περιστατικό εμφράγματος του μυοκαρδίου (myocardial infarction-MI). Η ταυτοποίηση της FH έγινε σύμφωνα με τα κλινικά κριτήρια του προγράμματος US MEDPED.

Αμέσως μετά τη διάγνωση καταγράφηκαν πληροφορίες σχετικά με το κάπνισμα και την κατανάλωση αλκοόλ, τις διατροφικές συνήθειες, και την άσκηση. Παράλληλα έγιναν σωματομετρικές μετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης, γλουτών). Υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index-BMI) σε kg/m^2 και ο λόγος περιφέρειας μέσης/γλουτών (waist to hip ratio-w/h ratio). Η τιμή της συστολικής πίεσης $>140\text{mmHg}$ και της διαστολικής $>90\text{mmHg}$ ή και κάθε περίπτωση ασθενούς που γινόταν χρήση αντιυπερτασικών φαρμάκων ορίστηκαν ως υπέρταση. Η διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη, για τον αποκλεισμό περιστατικών από τη μελέτη, έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια της Εξειδικευμένης Επιτροπής για τη Διάγνωση και Κατηγοριοποίηση του Σακχαρώδη Διαβήτη (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus) (γλυκόζη νηστείας στο αίμα $>6.9\text{mmol/l}$).

2.2 Αναλύσεις αίματος (γενικές, βιοχημικές).

Η λήψη δειγμάτων αίματος έγινε στη Μονάδα Λιπιδίων του τμήματος της Καρδιολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου νοσοκομείου, προκαθορισμένη πρωινή ώρα μεταξύ 8-10π.μ. μετά από 12ωρη νηστεία. Η γενική ανάλυση αίματος και οι βιοχημικές εξετάσεις (LDL-C, HDL-C, τριγλυκερίδια) έγιναν με εφαρμογή ενζυμικής μεθόδου χρωματογραφίας, (Technicon automatic analyser RA 1000) συμπεριλαμβανομένων και Apo-AI και B, και λιποπρωτεΐνης α (Lipoprotein a-Lp(a)) (BNII Dade Behring automatic nephelometer).

2.3 Εφαρμογή θεραπείας

Αμέσως μετά τη διάγνωση, στα άτομα χαμηλότερου κινδύνου (<25 ετών χωρίς CAD, γεροντότοξο ή ξανθώματα), έγινε έναρξη υγεινοδιαιτητικής αγωγής διάρκειας 45 ημερών σύμφωνα με τις οδηγίες του NCEP ATPIII. Η έναρξη της θεραπείας με στατίνη, σε αυτή την ομάδα, έγινε μετά από 45 ημέρες σύμφωνα με τις συμβουλές των καρδιολόγων της συνεργαζόμενης κλινικής. Οι ασθενείς προσέρχονταν στην κλινική ανά ενάμιση μήνα για επανάληψη σωματομετρικών μετρήσεων και εξετάσεων αίματος (γενικές, βιοχημικές και άλλων παραγόντων) έως να επιτευχθεί η ταυτοποίηση της δόσης του φαρμάκου.

Στα άτομα υψηλότερου κινδύνου (>25 ετών, με CAD ή γεροντότοξο ή ξανθώματα), έγινε έναρξη θεραπείας με στατίνη αμέσως μετά τη διάγνωση. Οι ασθενείς προσέρχονταν στην κλινική ανά ενάμιση μήνα για επανάληψη σωματομετρικών μετρήσεων και εξετάσεων αίματος (γενικές, βιοχημικές και άλλων παραγόντων) έως να επιτευχθεί η ταυτοποίηση της δόσης του φαρμάκου.

Μετά την ταυτοποίηση της δόσης του φαρμάκου, οι ασθενείς και των δύο ομάδων προσέρχονταν στην κλινική ανά 4-6 μήνες. Στόχος και στις δύο περιπτώσεις ήταν η μείωση των επιπέδων της LDL-C στο αίμα σε <100mg/dL.

2.4 Ασθενείς

Συνολικά στην έρευνα συμμετείχαν 183 ασθενείς με FH, εκ των οποίων 139 περιπτώσεις δείκτες (probands) και 44 συγγενείς τους. Χαρακτηριστικά τους ήταν η υψηλή TC (>290mg/dL) και LDL-C (>200mg/dL), υψηλότερη του 95^{ου} εκατοστημόριου για την ηλικία και το φύλο, ενώ τα επίπεδα TG ήταν φυσιολογικά (<175mg/dL). Η παρουσία θανατηφόρου ή μη, καρδιαγγειακού επεισοδίου (σύμφωνα με τις οδηγίες του WHO) μεταξύ συγγενών πρώτου ή δεύτερου βαθμού ήταν καθοριστική για την διάγνωση της FH. Ξανθώματα τενόντων δεν ήταν εμφανή σε όλες τις περιπτώσεις. Όλα τα δεδομένα (βιοχημικές και σωματομετρικές μετρήσεις των ασθενών) που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη αφορούν τιμές πριν την έναρξη της θεραπείας.

Μεταξύ των ασθενών ήταν και μια οικογένεια στην οποία βρέθηκε η πρωτοαναφερόμενη μετάλλαξη -45delT. Η πρώτη ασθενής από την οικογένεια (περίπτωση δείκτης) που απευθύνθηκε στο Λιπιδαιμικό τμήμα της Καρδιολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου νοσοκομείου λόγω υπερχοληστερολαιμίας, γεννήθηκε το 1962. Η ασθενής δεν ασκούταν συστηματικά, δεν κάπνιζε, και είχε φυσιολογική αρτηριακή πίεση και επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Όσον αφορά τις σωματομετρικές μετρήσεις, ο λόγος w/h ήταν 69cm/96cm (0.72) και το BMI 21.1kg/m². Στην ασθενή

δεν παρατηρήθηκαν γεροντότοξο ή ξανθώματα τενόντων. Τα επίπεδα λιπιδίων ήταν: TC 335mg/dL, HDL-C 49mg/dL, LDL-C 276mg/dL, TG 47mg/dL και Lp (a) 29mg/dL. Μετά από 6 μήνες εφαρμογής μεσογειακής δίαιτας με βάση τις οδηγίες TLC σε συνδυασμό με φαρμακευτική αγωγή (20mg/ημέρα ατορβαστατίνη), η LDL-C μειώθηκε κατά 40% (από 276mg/dL σε 176,4mg/dL). Ο πατέρας της ο οποίος ανέφερε ότι είχε υψηλή TC και LDL-C και είχε υποβληθεί σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης στην ηλικία των 70 ετών, κατέληξε πρόσφατα από CAD. Η ασθενής είχε 5 αδέρφια εκ των οποίων μόνο η μία αδερφή της ήταν υπερχοληστερολαιμική, ενώ οι υπόλοιποι είχαν φυσιολογικά επίπεδα χοληστερόλης.

Η Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου ενέκρινε τη μελέτη (Παράρτημα 2). Οι ασθενείς ενημερώθηκαν για την έρευνα και τα οφέλη της και για τη συμμετοχή τους ήταν απαραίτητη η ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους.

2.5 Γενετική ανάλυση

2.5.1 Απομόνωση DNA

Υλικά και όργανα

EDTA vacutainer (Becton Dickinson)

Puregene DNA Purification kit (Gentra)

Ρυθμιστικό διάλυμα ενυδάτωσης (Hydration Buffer) (Gentra)

Centrifuge 5810R Eppendorf

BioPhotometer Eppendorf

Περιγραφή

Από την αρχή της δειγματοληψίας και μέχρι την ολοκλήρωσή της έγινε απομόνωση γενωμικού DNA από 2ml ολικού αίματος συλλεγμένο σε vacutainer με EDTA. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε είτε (1) το kit Puregene DNA Purification σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ή (2) η μέθοδος NaCl όπως περιγράφεται από τους Miller et al., (Miller et al., 1988). Το DNA αραιώθηκε σε 200μl διαλύματος Hydration Buffer.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε με φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Το DNA αραιώθηκε 1:500 με απιονισμένο H₂O και στη συνέχεια μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (Optical Density-OD) στα 260 και στα 280nm. Με τη χρήση του λόγου OD260/OD280 εκτιμήθηκε η καθαρότητα του DNA. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε βάσει της ιδιότητας ότι 50μg/ml DNA έχουν OD ίσο με τη μονάδα στα 260nm. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε είναι:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{αραιώση} \times 50 \times \text{τιμή OD}_{260\text{nm}}$$

2.5.2 PCR για ανάλυση με DGGE

Υλικά και όργανα

Taq πολυμεράση Dynazyme EXT, Buffer (10x), MgCl₂ (Finzyme)

dNTPs (Invitrogen)

Ολιγονουκλεοτίδια-Εκκινητές (MWG Biotech)

Αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O

Quali PCR tubes 0.2ml (Kisker)

Θερμικός κυκλοποιητής (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της PCR επιτρέπει την εκλεκτική αντιγραφή ειδικών τμημάτων του DNA κατά εκατομμύρια φορές με μία αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται *in vitro* τον τρόπο με τον οποίο οι DNA πολυμεράσες του πυρήνα αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητών), ενός συμπληρωματικού προς το 5' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 5' άκρο της άλλης αλυσίδας. Οι εκκινητές, μήκους συνήθως 20-30 βάσεων, οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος και λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για *in vitro* σύνθεση DNA.

Για τον πολυμερισμό είναι απαραίτητη η παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεσοξυ-ριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72°C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C.

Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων (1) αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C), (2) σύνδεση εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες (σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών), (3) σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA κατά την 5'-3' κατεύθυνση (68-72°C). Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-40 φορές.

Για την ανάλυση του προϊόντος της PCR με DGGE είναι αναγκαία η προσθήκη 3 επιπλέον βημάτων (αποδιάταξη στους 99°C, και δημιουργία ετεροδιμερών και ομοδιμερών στους 65°C και 37°C) (Ενότητα 2.5.3).

Περιγραφή

Με PCR πολλαπλασιάστηκαν, τμήμα του γονιδίου *ApoB* που περιείχε τις μεταλλάξεις R3500Q, R3500W, ο υποκινητής και τα 18 εξόνια του *LDLR*.

Η αντίδραση έγινε σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml. Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα το οποίο περιείχε 2.5μl Buffer (10x), 15mM MgCl₂, 200μM dNTPs, 8pmols από τον κάθε εκκινητή (**Πίνακας 2.1**), 1unit Taq πολυμεράσης και αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O. Το μίγμα αναδεύτηκε και μοιράστηκε σε tubes και σε αυτό προστέθηκαν 200ng DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης με την προσθήκη του H₂O στο μίγμα ήταν 25μl.

Τα tubes μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή στον οποίο η διαδικασία της PCR έγινε σύμφωνα με τα προγράμματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.1**. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό κάθε περιοχής και η αλληλουχία GC του κάθε εκκινητή παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.2**.

Πίνακας 2.1. Πρόγραμμα της PCR για τον πολλαπλασιασμό των περιοχών που αναλύθηκαν με DGGE. Στο βήμα 3 (σύνδεση εκκινητών) οι θερμοκρασίες είναι α: για όλα τα εξόνια εκτός b: εξόνιο 4 (5'), c: εξόνιο 10 και *ApoB*, d: εξόνιο 11 και e: εξόνιο 15.

Βήμα	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	} x 40 κύκλοι
1	95	5	
2	94	1	
3	66 ^a , 60 ^b , 68 ^c , 65 ^d ,	5	
4	72	10	
5	99	7	
6	65	60	
7	37	60	

Πίνακας 2.2. Αλληλουχία των εκκινητών για τα εξόνια των γονιδίων *LDLR* και *ApoB* και αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων PCR.

Περιοχή/ Εξόνιο	Εκκινητής	Αλληλουχία Εκκινητή 5'-3'	Μέγεθος Προϊόντος (bp)
Υποκινητής	PF	bAGGACTGGAGTGGGAATCAGAGC	252
	PR	TGCTGTGTCCTAGCTGGAACCC	
1	1F	aTTGAAATGCTGTAAATGACGTGG	256
	1R	CTGGCGCCTGGAGCAAGC	
2	2F	bCGTGGTCAGTTTCTGATTCTGGCG	253
	2R	ATAAATGCATATCATGCCCAAAGG	
3	3F	bTCGGCCTCAGTGGGTCTTTCACT	268
	3R	CCCCAGGACTCAGATAGGC	
4 (5')	4IF	bACTGCGGCAGCGTCCCCGGC	297
	4IR	GGATGCAGGTGGAGCTGTTGC	

4 (3')	4IIF	ACCTGTGGTCCCGCCAGC	345
	4IIR	bCCAGGGACAGGTGATAGGACG	
5	5F	bGGCCCTGCTTGTCTCTCTGG	282
	5R	AGCAGCAAGGCACAGAGAATGG	
6	6F	bACGAACTGAGGCTCAGACACACC	262
	6R	GCTCCCCACAACTCTGCAAGC	
7	7F	bAGAGTGACCAGTCTGCATCCCTGG	253
	7R	TTGGTTGCCATGTCAGGAAGC	
8	8F	bTCCCCACCAAGCCTCTTCTCTC	222
	8R	CCACCCGCCGCCTTCC	
9	9F	cCTGACCTCGCTCCCCGGACC	278
	9R	GGCTGCAGGCAGGGGCGACG	
10	10F	GCAGTGAGATGAGGGCTCCTGG	349
	10R	bCCTGCAGCCCTCAGCGTCG	
11	11F	bGGATCCTCCCCCGCCCTC	239
	11R	TGGCTGGGACGGCTGTCC	
12	12F	GGCCCTCAGGCCCTCTGG	336
	12R	bCCGAGTTTTCTGCGTTCATCT	
13	13F	aGTCTCTTCCTTGCTGCCTG	264
	13R	CACAAGGAGGTTTCAAGGTTGG	
14	14F	aTCTCGTTCCTGCCCTGACTCC	274
	14R	GACACAGGACGCAGAAACAAGG	
15	15F	dGGCACGTGGCACTCAGAAGAC	288
	15R	GGTGTGGTGGCGGGCCAGTC	
16	16F	aCTCCATTCTTGGTGGCCTTCC	239
	16R	CATAGCGGGAGGCTGTGACCTGG	
17	17F	aGGGCAGCTGTGTGACAGAGCG	279
	17R	CATGGCTCTGGCTTTCTAGAGAGG	
18	18F	aCCTGAGTGCTGGAAGTATGTTTCC	190
	18R	AAGGCCGGCGAGGTCTCAGG	
<i>ApoB</i>	APOBF	bGGAGCAGTTGACCACAAGCTTAGC	382
	APOBR	GGTGGCTTTGCTTGTATGTTCTCC	

a: CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG

b: CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG

c: CGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGAAATAATAAA

d: CGG

2.5.3 DGGE

Υλικά και όργανα

40% ακρυλαμίδη/Bis 37.5/1 (Biorad)

Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS) (Biorad)

Φορμαμίδιο (Sigma)

Ουρία (Genaxis Biotechnology)

Tris Base (PRS Panreac)

Οξικό Οξύ (Merck)

EDTA (Genaxis Biotechnology)

TEMED (Sigma)
Διάλυμα TAE 50x
Falcon 50ml (Greiner)
Σύριγγες 25ml (Biorad)
Ρότορας (gradient maker) (Biorad)
Τζάμια παρασκευής πηκτώματος (Biorad)
Spacers (διαχωριστικά) (Biorad)
Σφιγκτήρες (clamps) (Biorad)
Βάση τοποθέτησης τζαμιών (Biorad)
Loading dye (Biorad)
D-Code Universal Detection System (Biorad)
Lighting Volt OSP-250I, Power Supply (Owl Scientific Inc.)
Χρωστική νουκλεϊκών οξέων πηκτώματος SYBR Gold (Molecular Probes)
High Performance Ultraviolet Transilluminator (UVP, Ultraviolet Products)

Αρχή της μεθόδου

Οι συνηθισμένες μορφές ηλεκτροφόρησης τμημάτων DNA, όπως αυτή σε πηκτώματα αγαρόζης έχουν τη δυνατότητα να διαχωρίζουν δύο τμήματα DNA σύμφωνα με το μέγεθος και τη διαμόρφωση τους. Αντίθετα η νουκλεοτιδική αλληλουχία των τμημάτων αυτών δεν επηρεάζει το διαχωρισμό τους. Το πρόβλημα επομένως της διαπίστωσης της ομοιότητας ή διαφοράς ως προς την αλληλουχία δύο μορίων DNA ίδιου μεγέθους απαιτεί μία διαφορετική προσέγγιση. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε μία άλλη ιδιότητα του DNA, η αποδιάταξη του. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη θραύση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες στη δίκλωνη έλικα με αποτέλεσμα τη μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο. Η διαδικασία αυτή καλείται και τήξη του DNA.

Διαπιστώθηκε ότι δύο μόρια DNA τα οποία έχουν το ίδιο μέγεθος και διαφέρουν ως προς τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, έστω και σε ένα μόλις νουκλεοτίδιο, έχουν διαφορετική συμπεριφορά τήξης. Η διαπίστωση αυτή στάθηκε η αφορμή για την ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού μορίων DNA.

Η μεθοδολογία DGGE (Fischer et al., 1979) αναφέρεται στην ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πηκτώματα πολυμερισμένης ακρυλαμίδης στα οποία υφίσταται ανιούσα κλίση αποδιατακτικών παραγόντων. Κατά την ηλεκτροφόρηση ενός μορίου DNA μέσα σε πήκτωμα στο οποίο υφίσταται γραμμική ανιούσα κλίση αποδιατακτικών παραγόντων όπως θερμοκρασία, ουρία και φορμαμίδιο με διεύθυνση ηλεκτροφόρησης παράλληλη προς την κλίση αυτή, το μόριο θα κινείται ως δίκλωνο μέχρι τη θέση του πηκτώματος όπου οι συνθήκες αντιστοιχούν στη θερμοκρασία τήξης του τμήματος DNA. Στη θέση αυτή η νουκλεοτιδική αλυσίδα μεταπίπτει σε

μονόκλωνη με αποτέλεσμα να αλλάζει η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του μορίου και η κίνησή του να υφίσταται ισχυρή ανάσχεση. Αν ηλεκτροφορούνται μαζί δύο μόρια DNA, τα οποία να διαφέρουν σε ένα έστω νουκλεοτίδιο στην περιοχή αυτή, τότε η συγκεκριμένη τήξη και στη συνέχεια ανάσχεση θα γίνει σε διαφορετική περιοχή του πηκτώματος για κάθε μόριο, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους.

Το πρόβλημα διαχωρισμού παραμένει στις περιοχές με την υψηλότερη θερμοκρασία τήξης στο μόριο. Αν συνεχιστεί η αποδιάταξη του μορίου τότε τήκονται και οι τελευταίες περιοχές, με αποτέλεσμα οι δύο αλυσίδες να διαχωρίζονται πλήρως και να χάνονται στο πήκτωμα, εφόσον δεν εστιάζονται σε συγκεκριμένο σημείο του. Η PCR με τη χρήση ειδικών εκκινήτων έχει την ικανότητα να προσθέσει μια αλληλουχία μήκους 40-60bp πολύ πλούσια σε κυτοσίνη και γουανίνη σε ένα δεδομένο τμήμα DNA που περιέχει μία περιοχή υψηλής και μια περιοχή χαμηλής θερμοκρασίας τήξης. Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλάξεων και στις δύο περιοχές. Αυτό συμβαίνει γιατί η προστιθέμενη περιοχή, λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας σε GC, έχει πολύ υψηλή θερμοκρασία τήξης, με αποτέλεσμα η ήδη υπάρχουσα περιοχή με υψηλή T_m του μορίου να αποδιατάσσεται νωρίτερα από την προηγούμενη. Κατά τον τρόπο αυτό η προστιθέμενη περιοχή, γνωστή ως GC-clamp, λειτουργεί ως “μανταλάκι”, διατηρώντας ενωμένες τις δύο αλυσίδες και πέραν του σημείου αποδιάταξης της δεύτερης περιοχής του μορίου ώστε αυτό να έχει τη δυνατότητα ηλεκτροφόρησης και διαχωρισμού σύμφωνα με τις αρχές της μεθόδου.

Η εικόνα που λαμβάνεται στην DGGE για ένα ομόζυγο φυσιολογικό άτομο είναι μία ζώνη, εστιασμένη σε συγκεκριμένο ύψος του πηκτώματος. Η εικόνα ενός ομόζυγου για κάποια μεταλλαγή ατόμου είναι και πάλι μία ζώνη, η οποία όμως εστιάζεται σε διαφορετικό σημείο του πηκτώματος. Στην περίπτωση ετεροζυγωτίας η εικόνα αλλάζει. Κατά κανόνα εμφανίζονται 4 ζώνες. Κάθε ζώνη αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο τύπο μορίου DNA. Εμφανίζονται λοιπόν μία ζώνη που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό DNA και μία ζώνη που αντιστοιχεί στο μεταλλαγμένο DNA. Οι δύο ζώνες αυτές ονομάζονται ομοδιμερή. Οι άλλες δύο ζώνες ονομάζονται ετεροδιμερή και οφείλονται στον ετερόλογο συνδυασμό των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Με άλλα λόγια τα ετεροδιμερή αποτελούνται από μία αλυσίδα προερχόμενη από το ένα γονίδιο και από μία άλλη από το άλλο γονίδιο.

Περιγραφή

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων έγινε με ανάλυση των προϊόντων της PCR σε DGGE.

Τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν μεταξύ δύο τζαμιών που χωρίζονται με spacers. Η μόνωση, στα πλευρικά σημεία στα οποία ενώνονται τα τζάμια έγινε με σφιγκτήρες (clamps), (σχηματίζεται “sandwich”). Η μόνωση στο κάτω μέρος του

“sandwich” έγινε τοποθετώντας το σε ειδική βάση. Στην κορυφή του καλουπιού τοποθετήθηκε μία “χτένα” για να σχηματιστούν “πηγάδια”.

Για την παρασκευή των πηκτωμάτων ήταν αναγκαία η χρήση διαλυμάτων περιεκτικότητας 0% και 80% αποδιατακτικών παραγόντων. Αυτά παρασκευάστηκαν με τα υλικά που παρουσιάζονται στους **Πίνακες 2.3, 2.4**.

Η παρασκευή των πηκτωμάτων ξεκίνησε με τοποθέτηση διαλύματος 0% και 80% αποδιατακτικών σε δύο δοχεία Falcon χωρητικότητας 50ml με (**Πίνακας 2.5**). Τα δύο διαλύματα που προέκυψαν είχαν όγκο 16ml και συγκεντρώσεις ίσες με τα όρια της επιθυμητής κλίσης (ένα χαμηλής και ένα υψηλής συγκέντρωσης) (**Πίνακας 2.5**). Σε αυτά προστέθηκε υπερθειικό αμμώνιο (APS), και TEMED και μεταφέρθηκαν από τα δοχεία Falcon σε δύο σύριγγες χωρητικότητας 25ml. Οι σύριγγες τοποθετήθηκαν στο ρότορα (gradient maker) (το διάλυμα με την υψηλή συγκέντρωση τοποθετείται στο πρώτο δοχείο και το διάλυμα χαμηλής στο δεύτερο). Ένας σωλήνας συνδέθηκε με τα άκρα των συριγγών και τοποθετήθηκε ανάμεσα στα τζάμια. Με αυτό τον τρόπο και τη χρήση του ρότορα δημιουργήθηκε πήκτωμα ανιούσας κλίσης αποδιατακτικών παραγόντων ανάμεσα στα τζάμια. Στον **Πίνακα 2.6** παρουσιάζεται η προτεινόμενη κλίση του πηκτώματος για κάθε περιοχή που αναλύθηκε. Ο πολυμερισμός του πηκτώματος ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα.

Στο πήκτωμα “φορτώθηκαν” 6-8μl προϊόντος PCR με 2μl χρωστικής (loading dye) και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή D-Code Universal Detection System στους 60°C, και 35V από τροφοδοτικό Lighting Volt, για 20 ώρες.

Η χρώση του πηκτώματος έγινε, αφού αφαιρέθηκε από τα τζάμια, σε 500ml διαλύματος χρώσης (500ml TAE 1x και 50μl χρωστικής νουκλεϊκών οξέων πηκτώματος SYBR Gold), για 15 λεπτά, και η εμφάνισή του σε συσκευή υπεριώδους φωτός (High Performance Ultraviolet Transilluminator).

Πίνακας 2.3. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πυκνών διαλυμάτων για χρήση σε DGGE

40%	50x	10% APS
Ακρυλαμίδη	Tris Acetate (TAE) pH 8.0	
	242.0g Tris Base	0.1g APS
40%	57.1ml Οξικό Οξύ	
Ακρυλαμίδη/Bis	100 ml 0.5M EDTA pH 8.0	
37.5/1	H ₂ O έως 1000 ml	H ₂ O έως 1ml
Αραίωση 1:50 με απιονισμένο H ₂ O για παρασκευή διαλύματος 1x		

Πίνακας 2.4. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων με 0% και 80% αποδιατακτικούς παράγοντες.

0% Αποδιατακτικοί	80% Αποδιατακτικοί
75ml 40% Ακρυλαμίδη	75ml 40% Ακρυλαμίδη
10ml 50x TAE	10ml 50x TAE 50x
	160ml Φορμαμίδιο
	170g Ουρία
H ₂ O έως 500ml	H ₂ O έως 500ml

Πίνακας 2.5. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτωμάτων με αποδιατακτικούς παράγοντες.

	20%	30%	40%	60%	70%	80%
Διάλυμα 0% (ml)	12	10	8	4	2	0
Διάλυμα 80% (ml)	4	6	8	12	14	16
APS 10% (μl)	130	130	130	130	130	130
TEMED (μl)	14	14	14	14	14	14

Πίνακας 2.6. Προτεινόμενη κλίση αποδιατακτικών παραγόντων για κάθε περιοχή που αναλύθηκε με DGGE.

Περιοχή/ Εξόνιο	% Κλίση
Υποκινητής, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 17	30-70
1, 4, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 18	40-80
<i>ApoB</i>	20-60

2.5.4 Ανάγνωση πρωτοδιάταξης DNA-Sequencing

Υλικά και όργανα

Quali PCR tubes 0.2ml (Kisker)

HotStart Taq πολυμεράση, Buffer (10x) με 15mM MgCl₂ (Qiagen)

Q solution 5x (Qiagen)

dNTPs (Invitrogen)

Αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O

Ολιγονουκλεοτίδια-Εκκινητές (MWG Biotech)

DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (ABI PRISM)

ABI 3700 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Applied Biosystems, CA)

Αρχή της μεθόδου

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται μια αλυσίδα DNA ως καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας, με καθορισμένη ποσότητα των διδέοξυ αναλόγων (τριφωσφορικά 2',3'-διδέοξυνουκλεοσίδια) των νουκλεοτιδίων (τριφωσφορικά δέοξυνουκλεοσίδια) από τα οποία λείπει η 3'-OH. Αποτέλεσμα είναι όταν ενσωματώνονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA να δρουν ως σημεία λήξης. Για τη διαδικασία απαιτείται ολιγονουκλεοτίδιο, συμπληρωματικό με ένα τμήμα του καλουπιού, που χρησιμεύει ως εκκινητής.

Το σύμπλεγμα καλουπιού-εκκινητή μοιράζεται σε 4 μέρη και στο καθένα προστίθεται DNA πολυμεράση. Ένα μέρος επωάζεται με μείγμα ddGTP και των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων, από τα οποία το ένα είναι σημασμένο με μια φθορίζουσα ομάδα. Καθώς αρχίζει ο πολυμερισμός του εκκινητή οι θέσεις της γουανίνης καταλαμβάνονται από το φυσιολογικό dG αλλά συχνά ενσωματώνεται ddGTP οπότε σταματάει ο πολυμερισμός. Παρόμοιες επωάσεις γίνονται και παρουσία καθενός από τα τρία υπόλοιπα ddNTPs, με αποτέλεσμα τη λήξη του πολυμερισμού στις θέσεις C, A ή T. Στο τέλος έχουμε μια σειρά από σημασμένες αλυσίδες, τα μήκη των οποίων θα εξαρτώνται από τη σχετική θέση της συγκεκριμένης βάσης από το άκρο του DNA. Τα τέσσερα μείγματα ηλεκτροφορούνται στο τέλος σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και γίνεται διαχωρισμός των αλυσίδων βάση του μήκους τους. Καθώς οι αλυσίδες ηλεκτροφορούνται περνούν από ανιχνευτή λέιζερ ο οποίος συμπίπτει με το τέλος του πηκτώματος. Εκεί μετριέται η απορρόφηση και μέσω προγράμματος υπολογιστή η εικόνα μετατρέπεται σε χρωματογράφημα.

Περιγραφή

Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων που βρέθηκαν με DGGE, επιβεβαιώθηκε με ανάγνωση της πρωτοδιάταξης του DNA. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας ήταν η PCR.

Η αντίδραση έγινε σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml. Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα το οποίο περιείχε 3μl Buffer με 15mM MgCl₂, 6μl Q solution, 200μM dNTPs, 20pmols από τον κάθε εκκινητή (**Πίνακας 2.7**), 1unit Taq πολυμεράσης και αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O. Το μίγμα αναδεύτηκε και μοιράστηκε σε tubes και σε αυτό προστέθηκαν 100ng DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης με την προσθήκη του H₂O στο μίγμα ήταν 30μl.

Τα tubes μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή όπου εφαρμόστηκε το πρόγραμμα: αποδιάταξη στους 95°C για 10', 30 κύκλοι: 95°C για 1', 60°C για 1',

72°C για 1'30'', τελική επιμήκυνση στους 72°C για 2'.

Στη συνέχεια η ανάγνωση της πρωτοδιάταξης του DNA έγινε με το kit DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing. Για την αντίδραση, που έγινε σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml, χρησιμοποιήθηκαν 4μl του προϊόντος της PCR, 4μl Termini-Mix, και 20pmols εκκινητή. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης με την προσθήκη απιονισμένου H₂O ήταν 20μl. Το πρόγραμμα για την ανάγνωση πρωτοδιάταξης ξεκίνησε με αποδιάταξη στους 90°C για 2'. Ακολούθησαν 30 κύκλοι: 95°C για 30'', 60°C ή 67° (για το εξόνιο 4(3')) για 30'', 55°C για 4'. Για τη ανάλυση της αλληλουχίας του προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής ABI 3700 Genetic Analyzer. Κάθε μετάλλαξη επιβεβαιώθηκε με την ανάγνωση δεύτερου δείγματος προς δύο κατευθύνσεις.

Πίνακας 2.7. Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάγνωση της πρωτοδιάταξης, των εξονίων του *LDLR* όπου βρέθηκαν μεταλλάξεις.

Περιοχή/ Εξόνιο	Εκκινητής	Αλληλουχία Εκκινητή 5'-3'
Υποκινητής	PF	AGGACTGGAGTGGGAATCAGAGC
	PrR	TGCTGTGTCTAGCTGGAACCC
1	1f	TTGAAATGCTGTAAATGACGTGG
	1r	CTGGCGCCTGGAGCAAGC
2	2f	CGTGGTCAGTTTCTGATTCTGGCG
	2r	ATAAATGCATATCATGCCCAAAGG
3	3f	TCGGCCTCAGTGGGTCTTTC
	3r	CCCCAGGACTCAGATAGGC
4 (5')	4lf	GACTGCGGCAGCGTCCCCGG
	4lr	GGATGC AGGTGGAGCTGTTGC
5	5f	GGCCCTGCTTGTTTTCTCTGG
	5r	AGCAGCAAGGCACAGAGAATGG
6	6f	ACGAACTGAGGCTCAGACACACC
	6r	GCTCCCCACAACTCTGCAAGC
8	8f	TCCCACCAAGCCTCTTCTCT
	8r	CCACCCGCCGCCTTCC
9	9f	CTGACCTCGCTCCCCGGACC
	9r	GGCTGCAGGCAGGGGCGACG
10	10f	GCAGTGAGATGAGGGCTCCTGG
	10r	GCAGTGAGATGAGGGCTCCTGG
11	11f	GGATCCTCCCCCGCCCTC
	11r	TGGCTGGGACGGCTGTCC
12	12f	GGCCCTCAGGCCCTCTGG
	12r	CCGAGTTTTCTGCGTTCATCTT
13	13f	GTATCTTCCTTGCTGCCTG
	13r	CACAAGGAG GTTCAAGGTTGG
14	14f	TCTCGTTCCTGCCCTGACTCC
	14r	GACACAGGACGCAGAAACAAGG

16	16f	GCTCCATTTCTTGGTGGCCTTCC
	16r	CATAGCGGGAGGCTGTGACCTGG
17	17f	GGGGCAGCTGTGTGACAGAGCG
	17r	CATGGCTCTGGCTTTCTAGAGAGG

2.5.5 Γρήγορη ανίχνευση μεταλλάξεων

Υλικά και όργανα

Ολιγινουκλεοτίδια-Εκκινητές (MWG Biotech)

Ταq πολυμεράση Dynazyme EXT, Buffer (10x), 15mM MgCl₂ (Finzyme)

dNTPs (Invitrogen)

MnI I, Buffer NE2 (10x) (New England Biolabs)

Αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O

Αγαρόζη

DNA Ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους) 100bp (Takara)

Nla III, Buffer NE4 (10x), BSA (100%) (New England Biolabs)

Quali PCR tubes 0.2ml (Kisker)

Quali PCR tubes 0.5ml (Kisker)

Θερμικός κυκλοποιητής (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler)

Αρχή της μεθόδου

Η εφαρμογή της μεθόδου πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση (restriction enzyme digestion) γίνεται συνήθως στα προϊόντα της PCR. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, και περιοριστικές επειδή η δραστηριότητά τους περιορίζεται σε "ξένο" DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια. Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μια περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε έχουν κολλώδη άκρα (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης.

Περιγραφή

Η μετάλλαξη -45delT στον υποκινητή του *LDLR* επιβεβαιώθηκε με PCR και

πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση καθώς η ύπαρξη της μετάλλαξης καταργεί την αλληλουχία σημείου κοπής του ενζύμου.

Το πρώτο στάδιο της ανάλυσης ήταν η εφαρμογή PCR στον υποκινητή του *LDLR*. Η αντίδραση έγινε σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml.

Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα το οποίο περιείχε 2.5μl Buffer (10x), 15mM $MgCl_2$, 200μM dNTPs, 10pmols από τους εκκινητές F 5'-AAGACATTTGAAAATCACC-3' και R 5'-AGGTTTCTAGCAGGGGG-3', 1unit Taq πολυμεράσης και αποστειρωμένο-απιονισμένο H_2O . Το μίγμα αναδεύτηκε, μοιράστηκε στα tubes και προστέθηκαν 200ng DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης με την προσθήκη του H_2O στο μίγμα ήταν 25μl.

Τα tubes μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή και το πρόγραμμα της PCR περιλάμβανε αποδιάταξη στους 95°C για 10', 30 κύκλους: 95°C για 45'', 56°C για 30'', 72°C για 30'', και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10'.

Ακολούθησε η πέψη του προϊόντος της PCR με την περιοριστική ενδονουκλεάση. Σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.5ml, τοποθετήθηκαν 10μl προϊόντος PCR (μεγέθους 51bp), 7 units της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Mnl* I, 2μl Buffer NE2 (10x) και αποστειρωμένο-απιονισμένο H_2O μέχρι τελικού όγκου 20μl. Η επώαση του μίγματος πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 3 ώρες.

Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 4%, (**Πίνακας 2.8**) και τα μεγέθη τους (51bp, 42bp, 9bp) ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 400ng μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους 100bp (Ενότητα 2.5.6).

Η μετάλλαξη V408M στο εξόνιο του *LDLR* επιβεβαιώθηκε με PCR και πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση καθώς η ύπαρξη της μετάλλαξης δημιουργεί αλληλουχία σημείου κοπής του ενζύμου.

Η PCR για το εξόνιο 9 του *LDLR* έγινε σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml. Αρχικά παρασκευάστηκε μίγμα το οποίο περιείχε 2.5μl Buffer (10x), 15mM $MgCl_2$, 200μM dNTPs, 8pmols των εκκινητών F 5'-GGCTGCAGGCAGGGGCGA-3' και R 5'-CTGACCTCGCTCCCCGGA-3', 1unit Taq πολυμεράσης και αποστειρωμένο-απιονισμένο H_2O . Το μίγμα αναδεύτηκε, μοιράστηκε στα tubes και προστέθηκαν 200ng DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης με την προσθήκη του H_2O στο μίγμα ήταν 25μl.

Τα tubes μεταφέρθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή. Το πρόγραμμα της PCR περιλάμβανε αποδιάταξη στους 95°C για 10', 30 κύκλους: 95°C για 45'', 60°C για 30'', 72°C για 30'' και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10'.

Ακολούθησε η πέψη του προϊόντος της PCR με την περιοριστική

ενδονουκλεάση. Σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.5ml, τοποθετήθηκαν 5μl προϊόντος PCR (μεγέθους 222bp), 5 units της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Nla* III, 2μl Buffer NE4 (10x), 1μl BSA (100%) και αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O μέχρι τελικού όγκου 10μl. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 3 ώρες.

Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5%, και τα μεγέθη τους (222bp, 123bp και 99bp) ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 400ng μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους 100bp (Ενότητα 2.5.6). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτωμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.8**.

2.5.6 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά και όργανα

Αγαρόζη (Invitrogen)

Tris Borate Buffer

Tris Base (PRS Panreac)

0.5M EDTA (Genaxis Biotechnology)

Βορικό Οξύ (AppliChem)

DNA Ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους) 100bp (Takara)

Lighting Volt OSP-250I, Power Supply (Owl Scientific Inc.)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης στηρίζεται στο γεγονός ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Όσον αφορά το μοριακό μέγεθος, η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

Περιγραφή

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% (Invitrogen), και της πέψης σε πηκτώματα συγκέντρωσης που αναφέρονται στην ενότητα 2.5.5.

Τα πηκτώματα παρασκευάστηκαν σε κωνική φιάλη με ανάμιξη διαλύματος Tris Borate Buffer 0.5x και αγαρόζης, ανάλογα με την επιθυμητή τελική συγκέντρωση του πηκτώματος (**Πίνακας 2.8**). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη, και αφού κρυώσει προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (**Πίνακας 2.8**). Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης όπου πολυμερίστηκε σε περίπου 30'.

Στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης προστέθηκαν 200ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5. Για τον έλεγχο της PCR ηλεκτροφορήθηκαν 4μl του προϊόντος της αντίδρασης, και για τον έλεγχο της πέψης 10μl του προϊόντος της αντίδρασης.

Η ηλεκτροφόρηση για τον επαρκή διαχωρισμό των τμημάτων DNA έγινε εφαρμόζοντας ρεύμα 5V/εκατοστό μήκους πεδίου με τροφοδοτικό, για 45-90 λεπτά.

Προκειμένου να καθοριστούν τα μεγέθη μορίων DNA <500bp χρησιμοποιήθηκαν 400ng μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους 100bp (Παράρτημα 5).

Πίνακας 2.8. Υλικά για την παρασκευή πηκτωμάτων αгарόζης.

Tris Borate (TBE) 5x	Για το πήκτωμα	0.7%	1%	2.5%	4%
54g Tris Base	Αγαρόζη (g)	0.7	1	2.5	4
27.5g Βορικό Οξύ	TBE 0.5 x (ml)	100	100	100	100
20ml 0.5M EDTA pH 8.0	Παρασκευή σε κωνική φιάλη και θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για διάλυση αгарόζης και προσθήκη 2μl βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml				
H ₂ O έως 1000ml					
pH 8.3					
Αραίωση 1:10 με H ₂ O για παρασκευή TBE 0.5x					

2.5.7 Long PCR

Υλικά και όργανα

Ταq πολυμεράση Expand Long Template PCR System, Buffer 3 (Roche)

dNTPs PCR Grade (Roche)

Ολιγινουκλεοτίδια-Εκκινητές (MWG Biotech)

Quali PCR tubes 0.2ml (Kisker)

Θερμικός κυκλοποιητής (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler)

Αρχή της μεθόδου

Η Long PCR είναι μια παραλλαγή της κλασσικής PCR (Ενότητα 2.5.2), με διαφορά την εφαρμογή της σε μεγαλύτερα τμήματα DNA. Τα όρια της περιοχής που πολλαπλασιάζεται καθορίζονται από τους εκκινητές. Εάν στο ένα χρωμόσωμα υπάρχει έλλειψη, εντός των ορίων των εκκινητών, το προϊόν της αντίδρασης θα αποτελείται από δύο τμήματα διαφορετικού μεγέθους: ενός φυσιολογικού μεγέθους και ενός μικρότερου, ανάλογα με το μέγεθος της έλλειψης σε bp. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (Ενότητα 2.5.8).

Περιγραφή

Η τεχνική εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μεγάλων ελλείψεων μεγέθους >500bp. Οι αντιδράσεις έγιναν σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml. Προετοιμάστηκαν δύο μίγματα αντίδρασης. Το πρώτο περιείχε 200μM dNTPs, και 9pmols από τον κάθε εκκινητή (**Πίνακας 2.10**) και είχε τελικό όγκο που αντιστοιχούσε σε 12.5μl για κάθε δείγμα που αναλύθηκε. Το μίγμα μοιράστηκε σε tubes όπου προστέθηκαν 200ng DNA, και υπέστη αρχική αποδιάταξη σε προθερμασμένο θερμικό κυκλοποιητή στους 94°C για 4'.

Μόλις ολοκληρώθηκε η αποδιάταξη προστέθηκε στα ίδια tubes το δεύτερο μίγμα το οποίο περιείχε 2.5 μl Buffer 3, 3 units Taq πολυμεράση και αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O μέχρι τελικού όγκου 12.5μl. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl.

Για την ανάλυση ολόκληρου του γονιδίου, ο *LDLR* χωρίστηκε σε 5 περιοχές υπερκαλύπτοντας η μία την άλλη (**Εικόνα 2.1**), και για κάθε μία έγινε ξεχωριστή αντίδραση.

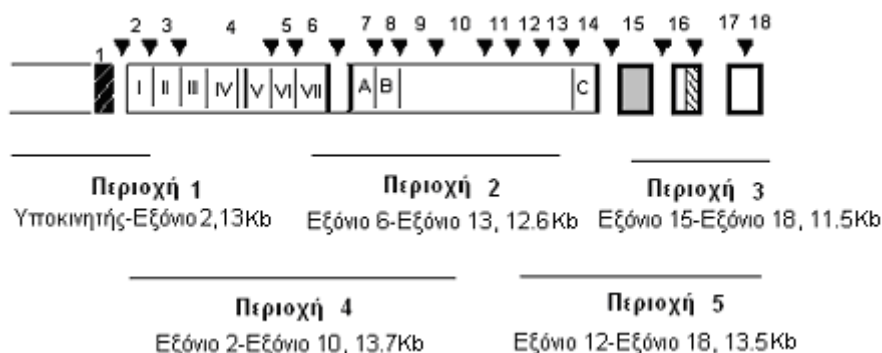
Οι εκκινητές και το πρόγραμμα της PCR για κάθε περιοχή παρουσιάζονται στους **Πίνακες 2.10** και **2.11** αντίστοιχα.

Πίνακας 2.10. Αλληλουχία των εκκινητών για τις περιοχές του *LDLR* που αναλύθηκαν με Long PCR.

Περιοχή	Εκκινητής	Αλληλουχία Εκκινητή 5'-3'
1	5907	CCTGGCGACACACTTTTGAAGG
	2R	ATAAATGCATATCATGCCCAAAGG
2	SP64	TCCTTCCTCTCTGGCTCTCACAG
	A2	CTCTTGGCTGGGTGAGGTGG
3	SP82	AGAAGACGTTTATTTATTCTTTTCAG
	N2	CAAACGATCCAGACTGGAGG
4	SP57	CCTTTCTCCTTTTCCTCTCTCTCSG
	SP73	AGCCCTCAGCGTCGTGGATACGCAC
5	SP76	TCTCCTTATCCACTTGTGTGTCTAG
	SP11	GCTTTGGTCTTCTCTGTCTTTGAAT

Πίνακας 2.11. Πρόγραμμα Long PCR για κάθε περιοχή του *LDLR* που αναλύθηκε για μεγάλες ανακατατάξεις.

Περιοχή 1		Περιοχές 2,4		Περιοχή 3		Περιοχή 5	
Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)
92	4min	92	4min	92	4min	92	4min
92	10sec	92	10sec	92	10sec	92	10sec
63	30sec	64	30sec	62	30sec	60	30sec
68	11min	68	11min	68	11min	68	11min
92	4min	92	4min	92	4min	92	4min
63	10sec	64	10sec	62	10sec	60	10sec
68	30sec	68	30sec	68	30sec	68	30sec
68	11min +15 sec/κύκλο	68	11min +15 sec/κύκλο	68	11min+15 sec/κύκλο	68	11 min +15 sec/κύκλο



Εικόνα 2.1. Το γονίδιο του *LDLR* χωρισμένο στις 5 περιοχές οι οποίες πολλαπλασιάστηκαν με Long PCR.

2.5.8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων Long PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά και όργανα

Αγαρόζη (Invitrogen)

Tris Borate Buffer

Tris Base (PRS Panreac)

0.5M EDTA (Genaxis Biotechnology)

Βορικό Οξύ (AppliChem)

DNA Ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους) 1kb+ (Invitrogen).

Lighting Volt OSP-250I, Power Supply (Owl Scientific Inc.)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της Long PCR σε πήκτωμα αγαρόζης ακολουθεί τις αρχές της ηλεκτροφόρησης προϊόντων της PCR (Ενότητα

2.5.6). Τα αναμενόμενα αποτελέσματα σε περίπτωση που υπάρχει έλλειψη είναι μία ζώνη φυσιολογικού μεγέθους που αντιστοιχεί στο φυσιολογικό αλληλόμορφο (**Εικόνα 2.1**) και μια ζώνη μικρότερου μεγέθους (σε bp) που αντιστοιχούν στην έλλειψη. Στην περίπτωση απουσίας έλλειψης, είναι ορατή μία ζώνη φυσιολογικού μεγέθους που αντιστοιχεί και στα δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα.

Περιγραφή

Από το προϊόν της Long PCR, 5μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 0.7% με διάλυμα Tris Borate 0.5x (**Πίνακας 2.8**), σε 50V, για 1 ώρα και 30 λεπτά για τον επαρκή διαχωρισμό των μορίων. Χρησιμοποιήθηκαν 400ng μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους 1kb+. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πηκτωμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.8**.

2.5.9 Πολλαπλή PCR για την ανάλυση πολυμορφισμών (Multiplex PCR)

Υλικά και όργανα

MicroAmp PCR Tubes (Perkin-Elmer Cetus)

dNTPs (Perkin-Elmer Cetus)

deaza-dGTP (Boehringer Mannheim Biochemichals)

DMSO

Tris-HCl (0.2M)

Πολυμεράση AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer Cetus)

Θερμικός κυκλοποιητής (Gene Amp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus)

Αποδιατακτικό διάλυμα (1.6% NaOH)

Μεμβράνη νάilon (Molecular Systems (Alameda, CA)

Αναδευτήρας επώασης (Hot Shaker plus, Bellco, Vineland)

SSPE (20x φωσφορικό νάτριο με NaCl EDTA)

SDS 20% (Roche Diagnostic Systems)

βιοτίνη/στρεπταβιδίνη και ραφανιδική υπεροξειδάση (Roche Diagnostic Systems)

Κιτρικό 40X (Roche Diagnostic Systems)

Υπόστρωμα A: H₂O₂ 0.01% σε κιτρικό διάλυμα (Roche Diagnostic Systems)

Υπόστρωμα B: 3,3',5,5' τετραμέθυλοβενζιδίνη 0,1% σε διμεθυλφορμαμίδιο 4X (Roche Diagnostic Systems)

Typing Tray wells (strips) (Roche Diagnostic Systems)

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της Multiplex PCR είναι ίδια με της PCR, με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται περισσότερα από δύο ζεύγη εκκινητών. Συνεπώς, το τελικό προϊόν της αντίδρασης περιέχει περισσότερες από μία πολλαπλασιασμένες περιοχές.

Η ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών των περιοχών αυτών μπορεί να γίνει με μοριακό υβριδισμό, τεχνική που βασίζεται στην ιδιότητα του μονόκλωνου DNA να ενώνεται (ζευγαρώνει) με συμπληρωματικές αλληλουχίες (ανιχνευτές) ακινητοποιημένες σε ειδική μεμβράνη.

Περιγραφή

Για τον γονότυπο της *ApoE* έγινε ανάλυση σε 104 ασθενείς περιπτώσεις δείκτες, για τους PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G σε 84 ασθενείς και για τους ANP A664G και T2238C σε 83. Τα άτομα που αναλύθηκαν για τους συγκεκριμένους πολυμορφισμούς δεν είχαν καμία συγγένεια μεταξύ τους και η επιλέχθηκαν τυχαία από το δείγμα των 139 ασθενών (probands). Το πρώτο στάδιο για την ανάλυση γνωστών πολυμορφισμών που σχετίζονται με την CAD ήταν 2 αντιδράσεις πολλαπλής PCR σε θερμικό κυκλοποιητή όπως περιγράφεται από τους Cheng et al., (Cheng et al., 1998, Cheng et al., 1999). Το κάθε δείγμα (50ng DNA) πολλαπλασιάστηκε παρουσία 20mM Tris-HCl, 8.5% DMSO, 0.1mM dNTPs, 0.3mM 7-deaza-dGTP, 1.7mM MgCl₂ και 7 units Taq πολυμεράσης AmpliTaq Gold. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 50μl. Το πρόγραμμα της PCR περιλάμβανε αποδιάταξη στους 94°C για 12.5', 33 κύκλους: 96°C για 15'', 60°C για 1', 72°C για 1.25', και τελική επιμήκυνση στους 68°C για 5'. (Cheng et al. 1998, Cheng et al., 1999).

Ακολούθησε η διαδικασία της υβριδοποίησης των προϊόντων της PCR σε μεμβάνες με ακινητοποιημένους ανιχνευτές. Ποσότητα 20μl προϊόντος της PCR αποδιατάχθηκαν με ίσο όγκο αποδιατακτικού διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε Typing Tray wells που περιείχαν 3ml διαλύματος υβριδοποίησης (4x SSPE, 0.5%SDS). Τα παραπάνω επώαστηκαν στους 52°C για 20'. Μετά από 20' το διάλυμα υβριδοποίησης απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε από διάλυμα που περιείχε 10μl SA-HRP. Η επώαση συνεχίστηκε για επιπλέον 5'. Το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε από διάλυμα 2x SSPE, 0.5%SDS και ακολούθησε περαιτέρω επώαση στους 52°C για 12'. Τα Typing Tray wells στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε 50mM κιτρικό Na σε θερμοκρασία δωματίου, και η εμφάνιση έγινε σε υπόστρωμα A: H₂O₂ 0.01% σε κιτρικό διάλυμα και υπόστρωμα B: 3,3',5,5' τετραμέθυλοβενζιδίνη 0,1% σε διμεθυλφορμαμίδιο 4x για 8-10' (Cheng et al. 1998, Cheng et al., 1999).

2.6 Μέτρηση της έκφρασης και της λειτουργικότητας του LDL-R με μετάλλαξη -45 delT

2.6.1 Απομόνωση mRNA από ασθενή με μετάλλαξη -45 delT

Υλικά και όργανα

PAXGENE Blood RNA (Qiagen)

Blood RNA Kit (Qiagen)

Eppendorf BioPhotometer

Περιγραφή

2.5ml αίματος από την ασθενή και ένα μάρτυρα συλλέχθηκαν σε δοχείο PAXGENE Blood RNA. Για την απομόνωση του mRNA χρησιμοποιήθηκε το kit Blood RNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποιότητα του RNA εκτιμήθηκε με φωτομέτρηση, μετά από αραίωση 1:100 σε 10μM Tris-Cl. Για την εκτίμηση της ποιότητας του RNA έγινε ηλεκτροφόρηση 1μg RNA σε πήκτωμα αгарόζης 1% (**Πίνακας 2.8**).

2.6.2 Αντίστροφης μεταγραφής PCR (Reverse Transcription PCR- RT-PCR)

Υλικά και όργανα

OneStep RT-PCR kit (Qiagen)

dNTPs (Invitrogen)

Ολιγονουκλεοτίδια-Εκκινητές (MWG Biotech)

Quali PCR tubes 0.2ml (Kisker)

Θερμικός κυκλοποιητής (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler)

Αρχή της μεθόδου

Η RT-PCR είναι μια τεχνική κατά την οποία το RNA μεταγράφεται αντίστροφα στο συμπληρωματικό κλώνο DNA (cDNA). Η μεταγραφή του RNA γίνεται με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση ενώ το RNA διασπάται από το ένζυμο RNase H και το τελικό προϊόν είναι cDNA. Στη συνέχεια το cDNA που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με PCR.

Περιγραφή

RT-PCR πραγματοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό του mRNA που αντιστοιχεί στα εξόνια 12 και 13 του *LDLR*. Η αντίδραση έγινε σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.2ml. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 5μl One-Step RT-PCR Buffer (5x), 5μl Q solution (5x), 200μM dNTPs, 12.5pmols από τους εκκινητές RT12F 5' GCCTCTACTGGGTTGACTCCA 3' και RT13R 5' TGAGGTGGAAGAGGACCATA 3', αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O και 1μl Enzyme Mix από το kit OneStep RT-PCR. Σε αυτό προστέθηκαν 600ng RNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl. Το

πρόγραμμα της RT-PCR περιλάμβανε αντίστροφη μεταγραφή στους 50°C για 30'. Η ενεργοποίηση της PCR έγινε στους 95°C για 15'. Ακολούθησαν 35 κύκλοι αποδιάταξης στους 94°C για 1', 54°C για 1', 72°C για 1' και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10'.

Το προϊόν της αντίδρασης (μεγέθους 393bp) περιείχε τον πολυμορφισμό *Hinc* II (C>T), στο εξόνιο 12, στην 54^η θέση του προϊόντος της RT-PCR.

2.6.3 Ποσοτικοποίηση της έκφρασης του mRNA

Υλικά και όργανα

Hinc II, NE3 Buffer (10x), BSA (100%) (New England Biolabs)

Quali PCR tubes 0.5ml (Kisker)

Αγαρόζη (Invitrogen)

DNA Ladder (μάρτυρας γνωστού μοριακού μεγέθους) PhiX174 RF (Invitrogen)

Πρόγραμμα BANDLEADER™ V3.00.

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή του RNA του γονιδίου σε cDNA και στη συνέχεια ανάλυση της έκφρασης του κάθε αλληλομόρφου με ηλεκτροφόρηση. Με την ολοκλήρωση της RT-PCR είναι διαθέσιμη η περιοχή που αναλύεται με τη μορφή cDNA, και χρειάζεται ένας τρόπος να εκτιμηθεί η έκφραση του κάθε αλληλομόρφου χωριστά. Ο πολυμορφισμός *Hinc* II (C>T) στο εξόνιο 12 βρέθηκε ότι κληρονομείται μαζί με την μετάλλαξη -45delT, ενώ το άλλο αλληλόμορφο ήταν φυσιολογικό και για την μετάλλαξη αλλά και για τον πολυμορφισμό. Χρησιμοποιώντας την πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση, που αναγνωρίζει την συγκεκριμένη αλληλουχία και εφόσον υπάρχει ετεροζυγωτία, και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, τα δύο αλληλόμορφα μπορούν να διαχωριστούν. Η ένταση των ζωνών που προκύπτουν, αντιστοιχούν στην έκφραση του κάθε αλληλομόρφου και μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση ειδικού προγράμματος ανάλυσης του πηκτώματος.

Περιγραφή

Σε 8μl του προϊόντος RT-PCR έγινε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση σε Quali PCR tubes χωρητικότητας 0.5ml. Χρησιμοποιήθηκαν 5 units του ενζύμου *Hinc* II, 2 μl BSA (100%) και 2μl NE3 Buffer (10x) και αποστειρωμένο-απιονισμένο H₂O. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20μl και επωάστηκε στους 37°C για 2 ώρες. Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2.5% (**Πίνακας 2.8**), και τα μεγέθη τους (393bp, 339bp και 54bp) επιβεβαιώθηκαν με χρήση 400ng μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους PhiX174 RF ενώ και άκοπο

προϊόν χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η ένταση των ζωνών που εμφανίστηκαν στο πήκτωμα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα BANDLEADER™ V3.00.

2.6.4 Μέτρηση της έκφρασης του LDL-R με δοκιμή πρόσδεσης σε ιωδιωμένη LDL (Dil-LDL)

Υλικά και όργανα

Dil-LDL (Molecular Probe, Inc)

LPDS (Human lipoprotein deficient serum) από δεξαμενή πλάσματος υγιών ατόμων RPMI 1640 (Gibco)

Πενικιλίνη, Στρεπτομυκίνη (Gibco)

Φυτοαιμοσυγκολιτίνη (Gibco)

DMSO (Sigma)

FACScan

CO₂ επωαστήρας (Mettler)

Αρχή της μεθόδου

Βασίζεται στην δοκιμή πρόσδεσης του υποδοχέα (receptor assay) από διάφορους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των μονοπύρηνων, σε Dil-LDL. Η μέτρηση της έκφρασης των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας γίνεται στη συνέχεια έμμεσα με κυτταρομετρία ροής, μέσω της ποσότητας της Dil-LDL που έχει προσληφθεί από τον υποδοχέα. Η κυτταρομετρία ροής σαρώνει πληθυσμούς κυττάρων που βρίσκονται σε υγρό μέσο και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση υποπληθυσμών (διαχωρισμός κυττάρων) αλλά και τη μέτρηση συμπλόκων υποδοχέων-προσδεμάτων (ποσοτική ανάλυση). Η αναμενόμενη μειωμένη πρόσληψη Dil-LDL από τον LDL-R, άρα και έκφραση του LDL-R, στο δείγμα ασθενούς σε σχέση με δείγμα υγιούς μάρτυρα, υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιας μετάλλαξης.

Περιγραφή

Περιφερικά μονοπύρηνια (peripheral blood mononuclear cells-PBMC) απομονώθηκαν σύμφωνα με τους Boyum et al. (Boyum et al., 1982). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 με 10% LPDS, 10u/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη με και χωρίς φυτοαιμοσυγκολλητίνη, στους 37°C παρουσία 5% CO₂ (Chan et al. 1998). Για τη σήμανση της LDL με Dil, 0.5mg πρωτεΐνης σε LPDS επωάστηκαν, για 18 ώρες στους 37°C, με 0.15μg Dil σε DMSO. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Traill et al. (Traill et al. 1986).

2.6.5 Επιμόλυνση

Υλικά και όργανα

Πλασμίδιο pGL3 (Promega)

QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene)

HepG2

RL-TK *Renilla* λουσιφεράση (Promega)

Lipofectin (Invitrogen)

Εμβρυϊκός ορός μόσχου (fetal bovine serum-FBS) (Gibco)

Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)

Tropix TR717 Microplate luminometer (Perkin Elmer)

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της επιμόλυνσης βασίζεται σε τεχνητά συστήματα έκφρασης. Χρησιμοποιείται ένα γονίδιο αναφοράς του οποίου η έκφραση εξαρτάται από την περιοχή που εισάγουμε στο πλασμίδιο και θέλουμε να μελετήσουμε. Τα πλασμίδια εισάγονται σε ανθρώπινα κύτταρα και εκφράζονται τα γονίδια που έχουμε εισάγει παράλληλα με τα γονίδια αναφοράς. Η λουσιφεράση είναι ένα γονίδιο του οποίου το προϊόν καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης με αποτέλεσμα την έκλυση κίτρινου χρώματος το οποίο ανιχνεύεται εύκολα. Η ένταση του χρώματος ταυτίζεται με την ικανότητα έκφρασης της αλληλουχίας που έχουμε εισάγει και μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε

Περιγραφή.

Περιοχή του *LDLR* μεγέθους 595bp (από τη θέση -5 έως -600), κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pGL3 (Promega) προσφορά της Κας Α. Soutar (Clinical Sciences Centre, Hammersmith Hospital, Λονδίνο). Τρία διαφορετικά ως προς την αλληλουχία ανασυνδυασμένα πλασμίδια προέκυψαν. Το πρώτο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο περιείχε υποκινητή του *LDLR* με την μετάλλαξη -45 T>C (Mozas et al., 2002). Ένα πλασμίδιο περιείχε υποκινητή *LDLR* φυσικού τύπου (wildtype) και ένα υποκινητή με την μετάλλαξη -45delT. Ο υποκινητής φυσικού τύπου και ο -45delT δημιουργήθηκαν με το kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με 100ng του κάθε ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και 1ng pRL-TK *Renilla* λουσιφεράση για το έλεγχο της επιτυχίας της επιμόλυνσης. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πλασμίδιο pGL3 που δεν περιείχε αλληλουχία υποκινητή. Οι επιμολύνσεις σε κύτταρα HepG2 έγιναν με το αντιδραστήριο Lipofectin (πολυμερές λιπιδίων που ενσωματώνεται στην πλασματική μεμβράνη και επιτρέπει την είσοδο του DNA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία και παρουσία 10% εμβρυϊκού ορού μόσχου (fetal bovine serum-FBS) (Gibco), και πραγματοποιήθηκαν 8 επαναλήψεις. Η έκφραση της λουσιφεράσης εκτιμήθηκε με το Dual Luciferase

Reporter Assay System (Promega) χρησιμοποιώντας τη συσκευή Tropix TR717 Microplate luminometer (Perkin Elmer).

2.7 Γεωγραφική κατανομή μεταλλάξεων

Η προέλευση των μεταλλάξεων στον *LDLR* έγινε σύμφωνα με την καταγωγή των ασθενών που τις έφεραν, και προέρχονταν από προγόνους που διέμεναν στην ίδια περιοχή για τουλάχιστον τρεις γενιές.

2.8 Ονοματολογία μεταλλάξεων (Nomenclature)

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται δύο τρόποι ονοματολογίας για τις μεταλλάξεις στον *LDLR* (βάση δεδομένων) www.umd.necker.fr. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι των Yamamoto et al., (Yamamoto et al., 1984) όπου η αρίθμηση είναι αρνητική για τα κωδικόνια του εξονίου 1.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.HGVS.org/mutnomen>) η αρίθμηση ξεκινάει από το νουκλεοτίδιο +1 στην βάση Α του ATG-κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης. Το κωδικόνιο ATG έναρξης της μετάφρασης αποτελεί και το πρώτο κωδικόνιο. Για τις μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο τρόποι.

2.9 Υπολογισμός συχνότητας αλληλομόρφων

Ο υπολογισμός της συχνότητας των πολυμορφισμών έγινε μετρώντας τα αλληλόμορφα για τα οποία έχει γίνει ανάλυση γονότυπου. Η απόκλιση από τη ισορροπία Hardy-Weinberg εκτιμήθηκε με το τεστ χ^2 . Η κατανομή Hardy-Weinberg ισχύει όταν σε τυχαία επιλεγμένα άτομα γίνεται γενετική ανάλυση για ένα γονίδιο δηλαδή για 2 αλληλόμορφα και υπολογίζεται η σχέση μεταξύ συχνότητας γονιδίου και συχνότητας αλληλομόρφων.

2.10 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως μέσες τιμές (mean values) $\pm$ τυπική απόκλιση (TA-standard deviation-SD), ενώ οι ποιοτικές μεταβλητές ως

απόλυτες (absolute) και σχετικές (relative) συχνότητες. Οι μέσες τιμές και οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των ομάδων που δημιουργήθηκαν με βάση το γενετικό προφίλ εκτιμήθηκαν με το μη παραμετρικό τεστ Mann Whitney ή Kruskal Wallis, λόγω του αριθμού των ασθενών και του γεγονότος ότι κάποιες βιοχημικές μετρήσεις δεν είχαν ομαλή κατανομή.

Οι ανεξάρτητες μεταβλητές κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής: 0 για γυναικείο, 1 για αντρικό φύλο, και 0 και 1 για απουσία και παρουσία χαρακτηριστικού, αντίστοιχα. Βάση των πληροφοριών στο <http://www.ucl.ac.uk/fh/> για την επίδραση των μεταλλάξεων στην λειτουργικότητα του LDL-R ως μεταλλάξεις ελαττωματικού υποδοχέα λήφθηκαν οι: C6W (15-30% δράση), A410T (5-15% δράση), G571E (5-15% δράση) και S265R (5-15% δράση), και ως αρνητικού υποδοχέα οι: del-45T (<5% δράση), Q363X (<2% δράση), V408M (<2% δράση), G528D (<2% δράση) και C660X (<2% δράση). Ο κωδικός 1 αποδόθηκε στις μεταλλάξεις ελαττωματικού υποδοχέα και 2 στις μεταλλάξεις αρνητικού υποδοχέα. Έγινε επίσης ανάλυση για την σύγκριση των επιπέδων λιπιδίων μεταξύ των ασθενών στους οποίους βρέθηκε μετάλλαξη και αυτών στους οποίους δεν βρέθηκε μετάλλαξη. Η κατηγοριοποίηση ήταν 0: για ασθενείς χωρίς μετάλλαξη και 1: για ασθενείς με μετάλλαξη.

Οι γονότυποι για τον πολυμορφισμό *ApoE* κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής: 1 για 23, 33 και 2 για 34, 44. Οι γονότυποι για άλλους πολυμορφισμούς κατηγοριοποιήθηκαν ως εξής: για τον PON-2 Ser311Cys 0: Cys/cys και Cys/Ser, 1: Ser/Ser, για τον LPL Asn291Ser 1: Asn/Asn, 2: Asn/ Ser, για τον PAI-1 T11053G 0: GG, 1: TT, 2: GT, για τον FGB G-455A 0: AA, 1: GG, 2: AG, για τον NOS A-922G 0: AA, 1: GG, 2: AG, για τον ANP G664A 0: GG 1: GA, και για τον T2238C 0: TT, 1: TC, CC.

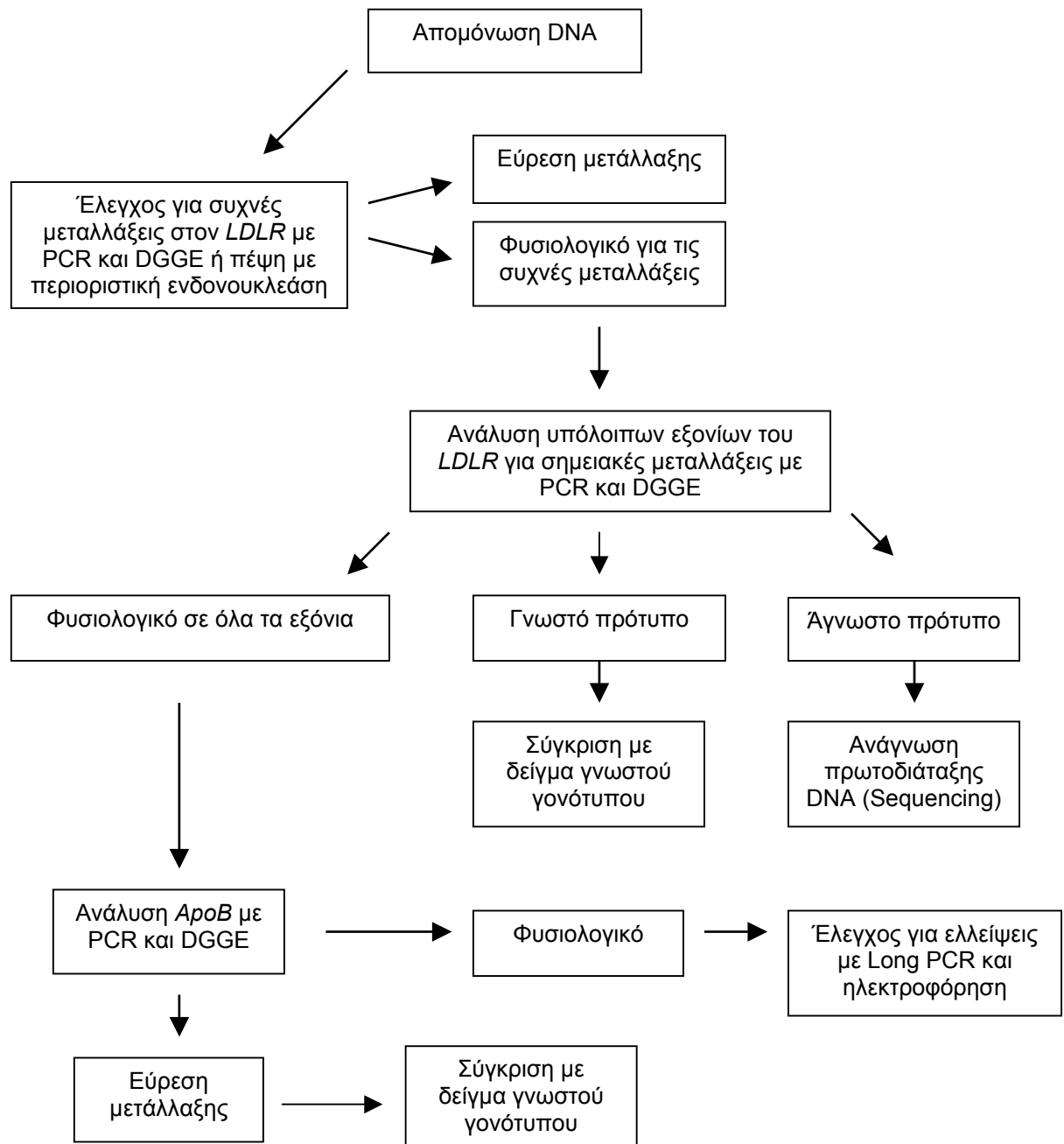
Η επίδραση των μεταλλάξεων του *LDLR* και των πολυμορφισμών στα επίπεδα λιπιδίων εκτιμήθηκε με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, όπου η ηλικία, το φύλο και το BMI χρησιμοποιήθηκαν ως συμεταβλητές

Η επίδραση των μεταλλάξεων του *LDLR* στην συχνότητα εμφάνισης CAD, ξανθωμάτων τενόντων και γεροντότοξου υπολογίστηκε με λογαριθμική παλινδρόμηση, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις μεταβλητές που φάνηκαν να επηρεάζουν τον φαινότυπο στη ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (ηλικία, φύλο, BMI).

Από τα αποτελέσματα της λογαριθμικής παλινδρόμησης παρουσιάζονται οι συντελεστές B και το τυπικό σφάλμα του συντελεστή. Λόγω των πολλαπλών αναλύσεων στατιστικής σημαντικότητας και το πλήθος του λάθους τύπου I (Type I error), εφαρμόστηκε το κριτήριο Bonferroni σε όλες τις αναλύσεις post hoc. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θεωρήθηκαν εκείνα με επίπεδα σημαντικότητας (p) μικρότερα του 0.05. Καταγράφονται, τέλος ο λόγος πιθανοτήτων (odds ratios-OR), τα

διαστήματα εμπιστοσύνης 95% (confidence intervals-CI) και η ερμηνευτική ικανότητα συσχέτισης (R^2).

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζονται περιληπτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη γενετική ανάλυση.



Εικόνα 2.2. Σχηματικό διάγραμμα των βημάτων που ακολουθήθηκαν για τη γενετική ανάλυση των ασθενών με FH.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών με FH

Στην παρούσα μελέτη έγινε διάγνωση FH σε 183 άτομα, σύμφωνα με τις οδηγίες του US MEDPED. Έγιναν σωματομετρικές μετρήσεις, και μετά από αιμοληψία πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για βιοχημικούς δείκτες.

Τα χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών κατά την διάγνωση, και πριν την έναρξη της θεραπείας, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**.

Πίνακας 3.1. Χαρακτηριστικά των 183 ασθενών με FH που συμμετείχαν στην μελέτη. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές±ΤΑ.

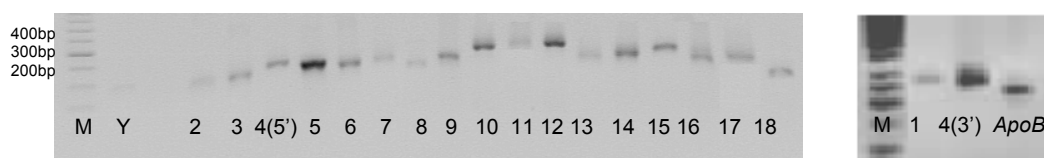
Αριθμός Ασθενών	183
Φύλο Άντρες/ Γυναίκες	102/81
Ηλικία (years)	42.0±16.0
BMI (kg/m ²)	24.77±3.67
W/H	0.81±0.13
Υπέρταση	23/183
CAD	25/183
Ξανθώματα Τενόντων	32/183
Γεροντότοξο	29/183
TC (mg/dL)	342.6±80.72
LDL-C (mg/dL)	271.5±77.8
HDL-C (mg/dL)	45.8±12.4
TG (mg/dL)	126.62±58.82
Apo-AI (mg/dL)	142.5±25.0
Apo-B (mg/dL)	196.0±53.6
LP (a) (mg/dL)	38±36
Μετάλλαξη <i>LDLR</i>	88/183

3.2 Αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης για τα γονίδια *LDLR* και *ApoB*

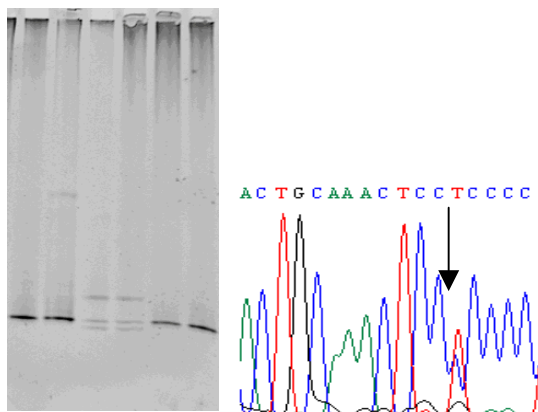
Η ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *LDLR* και *ApoB* έγινε με τη μέθοδο PCR και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης (**Εικόνα 3.1**) σε DGGE (**Εικόνες 3.2i, 3.2ii, 3.2iii**). Τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν μη φυσιολογικά πρότυπα στην ανάλυση DGGE, αναλύθηκαν περαιτέρω με ανάγνωση της πρωτοδιάταξης του DNA. Η παρουσία 4 ζωνών στα πηκτώματα υποδηλώνει

ετεροζυγωτία η οποία επιβεβαιώνεται με την παρουσία διπλής κορυφής στα χρωματογραφήματα (**Εικόνες 3.2i, 3.2ii, 3.2iii**).

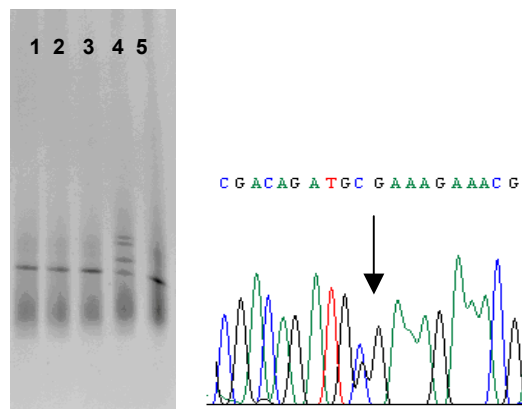
Η μετάλλαξη V408M στο εξόνιο 9 του LDLR ανιχνεύθηκε και με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Nla* III (**Εικόνα 3.3.a**). Η μετάλλαξη -45delT επιβεβαιώθηκε και με πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Mnl* I (**Εικόνα 3.3.b**). Σε 10 ασθενείς με FH, των οποίων τα χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**, και στους οποίους δεν βρέθηκε μετάλλαξη στα γονίδια *LDLR* και *ApoB* έγινε ανάλυση για μεγάλες ανακατατάξεις. Το γονίδιο του *LDLR* αναλύθηκε με Long PCR (**Εικόνα 3.4**). Σε κανένα από τους ασθενείς για τους οποίους πραγματοποιήθηκε αυτή η ανάλυση δεν βρέθηκε μεγάλη ανακατάταξη.



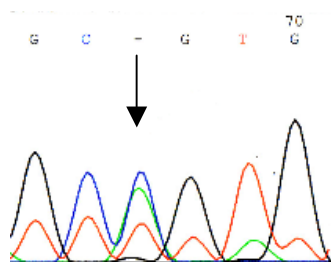
Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας 100bp (M). Στις εικόνες i και ii φαίνονται οι ζώνες που αντιπροσωπεύουν τις περιοχές που πολλαπλασιάστηκαν, τον υποκινητή (Y), τα 18 εξόνια του *LDLR*, και περιοχή του *ApoB*.



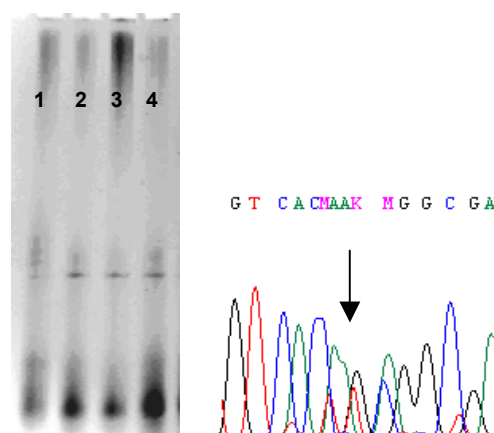
a. Υποκινητής: -45delT



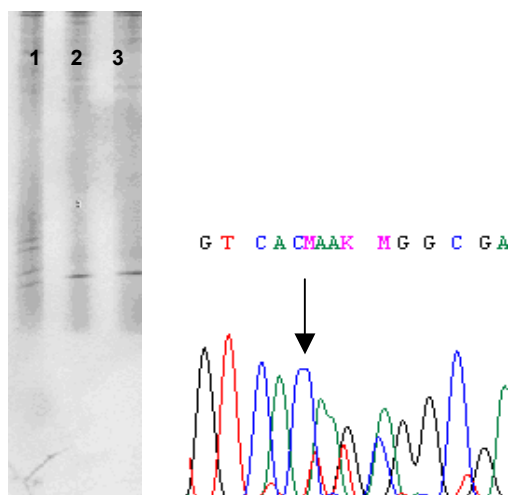
b. Εξόνιο 2: 81T>G, C6W



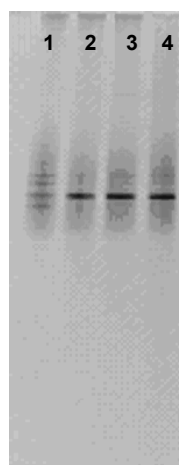
c. Εξόνιο 5: 761 A>C, Q233P



d. Εξόνιο 6: 858 C>A, S265R

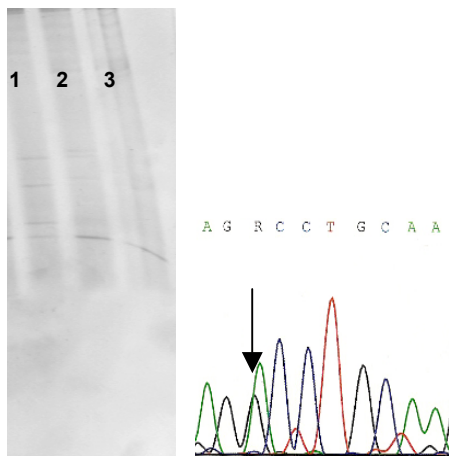


e. Εξόνιο 8: 1150 C>T και 1158 C>G, Q363X και D365E

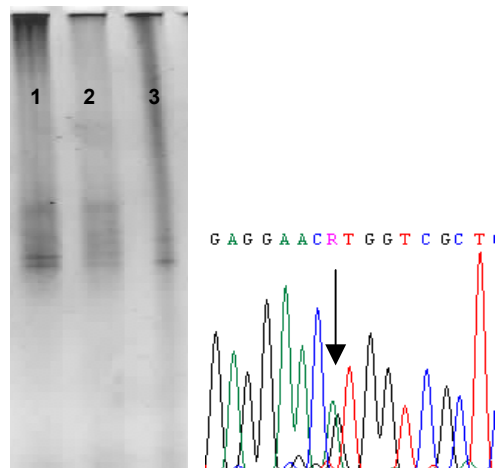


f. Εξόνιο 8: 1151 A>G, Q363P

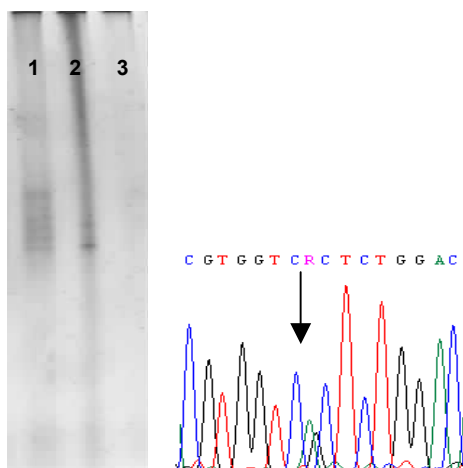
Εικόνα 3.2.i. Αποτελέσματα ανάλυσης του *LDLR* με DGGE και ανάγνωση της πρωτοδιάταξης του υποκινητή και των εξονίων 2, 5, 6 και 8. a) -del45T στις θέσεις 3 και 4. b) C6W στη θέση 4. c) Q233P στη θέση 3. d) S265R στη θέση 1. e) Q363X και D365E στη θέση 1. f) Q363P στη θέση 1.



a. Εξόνιο 8: 117. C>T, R>Q



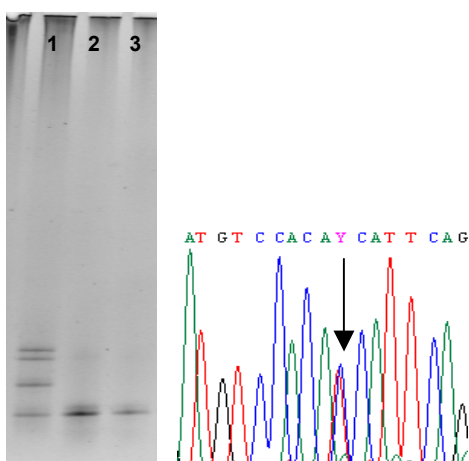
b. Εξόνιο 9: 1285 G>A, V408M



c. Εξόνιο 9: 1291 G>A, A410T



d. Εξόνιο 11: 1618 G>A, A519T

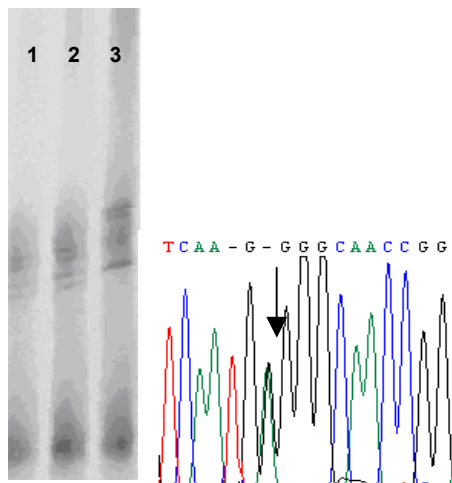


e. Εξόνιο 11: 1646 G>A, G528D

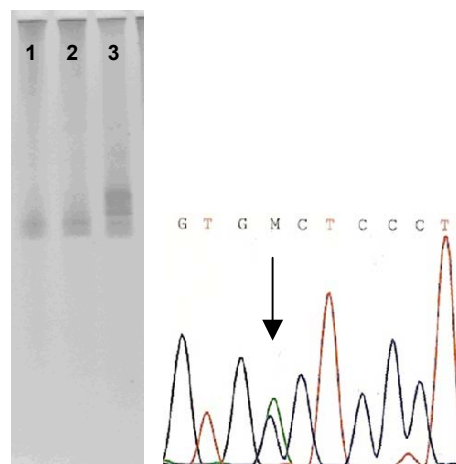


f. Εξόνιο 11: 1706-10 G>A

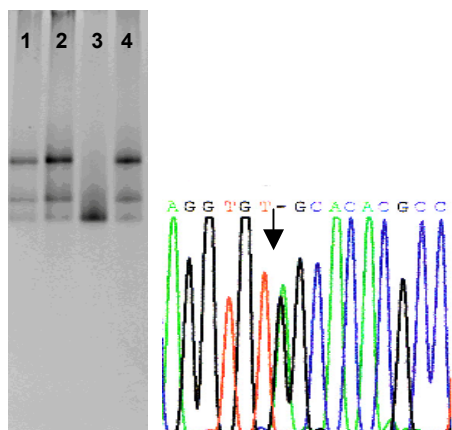
Εικόνα 3.2.ii. Αποτελέσματα ανάλυσης του *LDLR* με DGGE και ανάγνωση της πρωτοδιάταξης των εξονίων 8, 9 και 11. a) A370T στη θέση 1. b) V408M στη θέση 1. c) A410T στη θέση 1. d) A519T στη θέση 1. e) G528D στη θέση 1. f) 1706-10 G>A στη θέση 1.



a. Εξόνιο 12: 1775 G>A, G571E

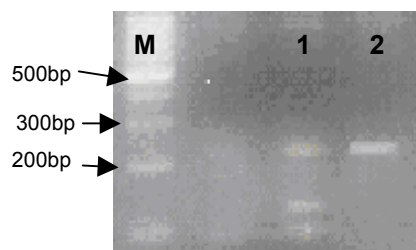


b. Εξόνιο 14: 2043 G>A, C660X

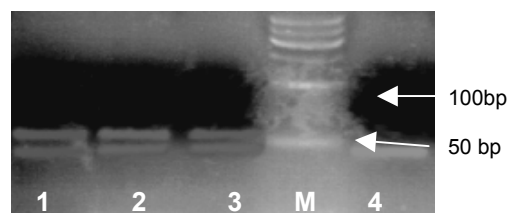


c. Εξόνιο 14: 2140+5 G>A, 2140+9 C>T

Εικόνα 3.2.iii. Αποτελέσματα ανάλυσης του *LDLR* με DGGE και ανάγνωση της πρωτοδιάταξης των εξονίων 12 και 14. a) G571E στη θέση 3. b) C660X στη θέση 3. c) 2140+5 G>A, 2140+9 C>T στις θέσεις 1, 2, 4.



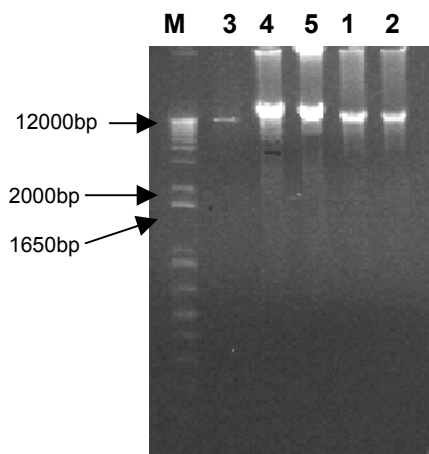
Εικόνα 3.3.i. Ηλεκτροφόρηση της πέψης του εξονίου 9 του *LDLR* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Nla* III, σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%. M, μάρτυρας 100bp, 1, ασθενής ετεροζυγώτης για την V408M ο οποίος παρουσιάζει 3 ζώνες 222bp, 123bp και 99bp και 2, φυσιολογικός μάρτυρας ο οποίος παρουσιάζει μια ζώνη 222bp.



Εικόνα 3.4.ii. Ηλεκτροφόρηση της πέψης του υποκινητή του *LDLR* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Mnl* I σε πήκτωμα αγαρόζης 4%. Στις θέσεις 1, 2, 3 παρουσιάζονται μέλη της οικογένειας που φέρουν τη μετάλλαξη -45delT στο ένα χρωμόσωμα και παρουσιάζουν 3 ζώνες 51bp, 42bp και 9bp. Στη θέση 4 είναι φυσιολογικός μάρτυρας ο οποίος παρουσιάζει 2 ζώνες 42bp και 9bp (η ζώνη 9 bp δεν φαίνεται στο πήκτωμα λόγω μικρού μεγέθους).

Πίνακας 3.2. Χαρακτηριστικά των 10 ασθενών με FH για τους οποίους έγινε ανάλυση με Long PCR. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ ΤΑ.

Αριθμός Ασθενών	10
Φύλο Άντρες/ Γυναίκες	7/3
Ηλικία (years)	34.7 $\pm$ 11.9
BMI (kg/m ²)	24.7 $\pm$ 4.3
W/H	0.89 $\pm$ 0.45
Υπέρταση	1/10
CAD	1/10
Ξανθώματα Τενόντων	2/10
Γεροντότοξο	9/10
TC (mg/dL)	342.6 $\pm$ 80.72
LDL-C (mg/dL)	228.0 $\pm$ 80.5
HDL-C (mg/dL)	43.0 $\pm$ 5.3
TG (mg/dL)	154.5 $\pm$ 24.6
Apo-AI (mg/dL)	149.8 $\pm$ 11.7
Apo-B (mg/dL)	192.5 $\pm$ 51.7
LP (a) (mg/dL)	24.6 $\pm$ 23.2



Εικόνα 3.4. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων Long PCR σε πήκτωμα αгарόζης 0.7%. Στο πήκτωμα φαίνονται οι περιοχές του *LDLR* που αναλύθηκαν με τη σειρά: περιοχή 3 (11.5Kb), περιοχή 4 (13.7Kb), περιοχή 5 (13.5Kb), περιοχή 1 (13Kb), και περιοχή 2 (12.6Kb), δίπλα σε μάρτυρα 1Kb+ (M).

3.3 Οι μεταλλάξεις του *LDLR* στον Ελληνικό πληθυσμό και η γεωγραφική κατανομή τους

Από τους 183 ασθενείς που αναλύθηκαν σε κανέναν δεν βρέθηκε μετάλλαξη στο γονίδιο *ApoB* αλλά ούτε και μεγάλες ανακατατάξεις σε όσους έγινε ανάλυση γι' αυτές. Με τη μέθοδο DGGE βρέθηκαν 17 μεταλλάξεις σε 67 ασθενείς και 11 συγγενείς αυτών, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν με ανάγνωση της πρωτοδιάταξης του DNA. Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των 67 ασθενών στους οποίους βρέθηκαν μεταλλάξεις. Το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων με τη μέθοδο DGGE ήταν 43%. Οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν στον υποκινητή και σε οκτώ εξόνια του *LDLR* (2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, και 14) (**Πίνακας 3.4**).

Έντεκα από αυτές είναι παρερμηνεύσιμες (C6W, Q233P, S265R, A370T, Q363P, D365E, V408M, A410T, A519T, G528D, G571E), δύο ανερμηνεύσιμες (Q363X και C660X), τρεις νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις που πιθανό να επηρεάζουν το μάτισμα του mRNA (splice site) (2140+5 G>A και 2140+9 C>T, 1706-10 G>A) και μία έλλειψη βάσης στον υποκινητή του *LDLR* (-45delT). Από τις παραπάνω οι A410T, A519T, 1706-10 G>A και 2140+9 C>T, βρέθηκαν για πρώτη φορά στην Ελλάδα και η -45delT αναφέρθηκε για πρώτη φορά στον κόσμο (**Πίνακας 3.4**). Η νουκλεοτιδική αντικατάσταση ματίσματος 2140+5 C>T φαίνεται να κληρονομείται μαζί με την 2140+9 G>A στον πληθυσμό που μελετήθηκε. Τρεις από τους 6 ασθενείς οι οποίοι έφεραν τις μεταλλάξεις αυτές ανήκαν στην ίδια οικογένεια και οι ίδιοι τρεις ασθενείς ήταν διπλοί ετεροζυγώτες για τις μεταλλάξεις Q363X και D365E.

Τέσσερις μεταλλάξεις βρέθηκαν με μεγάλη συχνότητα (**Πίνακας 3.4**). Η V408M, γνωστή και ως Africaner-2 έχει συχνότητα 9.9%, η G528D ή Genoa Palermo έχει συχνότητα 7.7%, η C6W ή San Francisco έχει συχνότητα 4.9% και τέλος η S265R γνωστή και ως Greece-2 έχει συχνότητα 3.8% (**Πίνακας 3.4**). Αυτές οι μεταλλάξεις βρέθηκαν στο 73% των ατόμων στα οποία ανιχνεύθηκε μετάλλαξη. Στη συνέχεια έγινε γεωγραφική κατανομή των μεταλλάξεων. Κατά τη διάρκεια της μελέτης διαπιστώθηκε ότι κάποιες μεταλλάξεις εμφανίζονταν με μεγαλύτερη συχνότητα σε συγκεκριμένες περιοχές της Ελλάδας. Στην **Εικόνα 3.5** παρουσιάζεται η γεωγραφική κατανομή των τεσσάρων πιο συχνών μεταλλάξεων που βρέθηκαν στον *LDLR* σύμφωνα με την καταγωγή των ασθενών που τις έφεραν, και προέρχονταν από προγόνους που διέμεναν στην ίδια περιοχή για τουλάχιστον τρεις γενιές.

Η V408M είναι πιο συχνή στην κεντρική δυτική Ελλάδα και την περιοχή του Αγρινίου. Όπως φαίνεται οι μισοί ασθενείς που φέρουν την παραπάνω μετάλλαξη κατάγονται από αυτή την περιοχή. Επιπλέον, η μετάλλαξη C6W βρέθηκε σε ασθενείς που κατάγονται από την κεντρική ανατολική Ελλάδα και την περιοχή της Λαμίας.

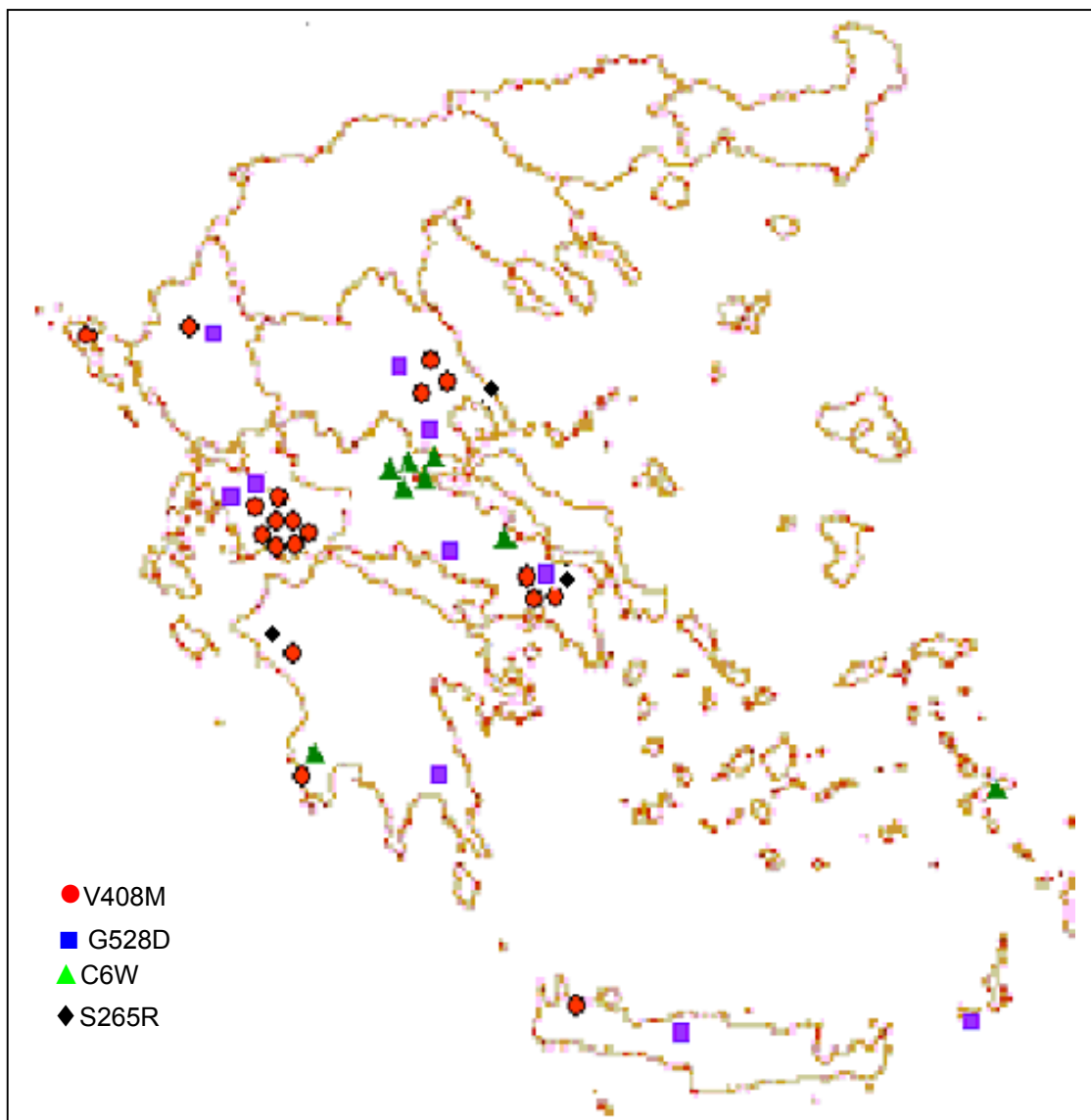
Πίνακας 3.3. Κλινικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων δεικτών στους οποίους βρέθηκε μετάλλαξη. Η: Ηλικία, ΑΥ: Αρτηριακή Υπέρταση, Κ: Κάπνισμα, ΞΤ: Ξανθώματα τενόντων, Γ: Γεροντότοξο. Η παρουσία χαρακτηριστικού συμβολίζεται με 1 και η απουσία με 0. Όλες οι τιμές λιπιδίων εκφράζονται ως mg/dL.

Μετάλλαξη	Ααθενής	Φύλο	H	BMI	W/H	ΑΥ	CAD	K	ΞΤ	Γ	TC	TG	LDL	HDL	Apo-AI	Apo-B	Lp (a)
-45delT	273	Γ	37	20.9	0.72	0	0	0	0	0	335	47	277	49	169	251	29
81 T>G	M11	A	65	28.0	0.95	1	1	0	0	0	326	192	248	40	135	224	81
	291	Γ	48	26.0	0.86	0	0	0	0	0	343	165	263	45	161	201	83
	275	A	54	28.0	0.8	0	0	1	0	1	350	171	288	27	119	225	61
	Π4	Γ	51	24.8	0.76	0	0	0	0	0	325	231	224	55	173	214	125
	Σ24	A	53	21.8	0.68	0	0	0	0	0	287	87	184	81	194	194	17
	Σ23	Γ	38	20.0	0.79	0	0	1	0	0	276	80	214	46	130	143	12
	288	A	55	26.1	0.9	0	0	0	1	0	467	128	379	63	167	266	75
761 A>C	M15	A	58	23.8	0.8	0	1	0	0	0	293	179	228	29	111	224	117
858 C>A	M26	Γ	29	20.7	0.67	0	0	1	0	0	280	70	206	60	160	175	20
	218	A	16	22.2	0.75	0	0	0	0	0	227	54	186	30	111	146	29
	A5	A	40	30.0	0.95	0	1	0	0	0	228	270	150	24	109	155	22
	A9	Γ	21	26.0	0.69	0	0	0	0	0	251	54	205	35	129	168	19
	Π16	A	30	23.0	0.83	0	0	0	0	0	227	54	186	30	111	146	29
	20	Γ	32	27.5	0.72	0	0	1	0	0	380	75	321	44	154	210	15
	B3	Γ	34	26.0	0.74	0	0	0	0	0	328	65	274	41	177	190	125
1150 C>T	Γ1	Γ	35	22.0	0.73	0	0	0	1	1	400	97	342	39	138	203	10
1151 A>G	58	Γ	38	23.8	0.86	0	0	1	0	0	258	73	233	37	139	201	30
1158 C>G	Γ1	Γ	35	22.0	0.73	0	0	0	1	1	400	97	342	39	138	203	10

Μετάλλαξη	Ασθενής	Φύλο	H	BMI	W/H	AY	CAD	K	ΞΤ	Γ	TC	TG	LDL	HDL	Apo-AI	Apo-B	Lp (a)
1171 G>A	22	A	44	26.2	0.94	0	0	1	1	0	302	128	235	41	141	182	10
	216	A	45	19.6	0.78	0	0	1	1	0	385	61	338	35	138	231	30
	Π13	A	61	24.7	0.85	0	0	0	0	0	309	90	248	43	124	198	58
	297	A	46	31.5	0.77	0	0	1	0	0	307	290	218	31	142	218	23
	Φ3	Γ	20	20.3	0.67	0	0	0	0	0	314	90	236	60	155	140	25
1285 G>A	Λ2	A	18	18.3	0.79	0	0	1	0	0	322	56	262	49	120	141	20
	K18	A	48	34.0	1.05	0	1	0	0	0	254	214	174	33	119	122	13
	K36	A	45	23.4	0.91	1	1	0	0	0	376	159	307	37	120	247	53
	M19	A	43	20.5	0.81	0	0	0	1	1	321	111	216	29	130	210	133
	M18	A	49	25.1	0.85	0	0	1	1	1	393	97	332	42	148	268	95
	Π3	A	34	30.6	0.94	0	1	0	1	1	475	218	388	60	140	248	137
	X4	A	32	26.2	0.86	0	0	0	0	0	442	108	342	72	126	229	22
	A10	Γ	46	23.4	0.73	0	1	0	0	0	377	226	285	47	154	259	17
	K31	Γ	67	22.4	0.71	0	0	0	0	0	334	63	284	37	135	197	54
	243	Γ	45	21.2	0.65	1	0	0	0	0	382	127	305	38	133	249	11
	K19	Γ	42	27.7	0.79	0	0	0	0	0	434	135	322	85	150	201	35
	277	Γ	52	26.0	0.78	0	0	0	0	1	445	193	398	47	172	247	17
	M27	Γ	52	24.0	0.69	1	1	0	0	0	253	119	189	40	145	167	133
	21	Γ	50	27.9	0.78	1	0	1	0	0	282	38	232	42	125	171	19
	281	Γ	34	28.1	0.79	0	0	0	0	0	275	64	211	51	163	161	19
	285	Γ	57	25.4	0.75	1	0	0	0	1	401	121	326	51	160	210	11
	242	Γ	17	21.6	0.68	0	0	0	0	0	288	46	243	36	127	196	19
	M21	Γ	50	18.0	0.68	0	0	1	1	0	331	91	263	50	146	181	27
1291 G>A	Ξ1	A	36	22.3	0.74	0	0	0	0	0	312	55	220	78	160	147	20
1618 G>A	A15	A	25	25.9	0.85	0	0	0	0	0	319	91	260	41	102	174	29
1646 G>A	Γ20	A	59	30.8	1.04	0	0	1	0	0	248	154	279	38	138	150	10
	P3	Γ	15	17.5	0.72	0	0	0	0	0	203	62	152	39	111	92	11
	Γ17	A	50	28.7	0.51	1	0	0	0	0	686	273	570	61	175	163	18
	Δ5	A	33	25.0	0.91	0	0	0	0	0	314	88	252	44	152	162	8
	Γ24	A	26	25.0	0.84	0	0	0	0	0	408	124	349	34	113	234	12
	K21	A	18	24.2	0.94	0	0	0	0	0	326	77	270	38	90	205	25
	351	A	62	25.7	0.93	0	1	0	1	1	345	127	245	74	181	230	48
	K39	A	34	20.0	0.93	0	1	0	1	0	257	86	214	25	71	196	40
	Π17	Γ	52	20.6	0.74	0	0	0	0	0	420	182	324	60	130	181	64
	Σ14	A	44	24.0	0.88	0	1	0	0	0	321	177	248	38	108	221	72
	Σ15	Γ	31	22.0	0.73	0	0	0	0	0	337	86	271	86	150	186	19
	X2	Γ	36	23.4	0.78	0	0	0	0	0	401	152	326	44	140	253	44
	M23	Γ	57	23.3	0.8	0	0	1	1	0	311	172	244	32	125	190	24
	K30	A	56	26.6	0.93	0	1	0	0	0	300	109	245	54	201	230	90
	M25	A	18	26.6	0.87	0	0	0	0	0	253	101	195	37	114	180	10
1706-10 G>A	353	Γ		28.1	0.68	0	0	0	0	0	275	64	211	51	163	161	42
1775 G>A	M10	A	59	27.3	0.92	0	0	1	1	0	240	157	204	34	127	173	21
2043 G>A	I2	A	33	26.3	0.9	0	0	0	1	0	329	174	257	37	124	171	21
2140+5 G>A 2140+9 C>T	357	Γ	28	20.4	0.73	1	1	1	1	1	258	91	189	51	175	164	15
	347	Γ	44	22.2	0.70	0	0	1	0	1	378	100	302	64	154	199	8
	Γ1	Γ	35	22.0	0.73	0	0	0	1	1	400	97	342	39	138	203	10

Πίνακας 3.4. Συχνότητα των 17 μεταλλάξεων που βρέθηκαν στους ασθενείς με FH. Στις παρενθέσεις παρουσιάζεται η νέα ονοματολογία των μεταλλάξεων σύμφωνα με τις οδηγίες του HUGO (<http://www.HGVS.org/mutnomen/>).

Περιοχή	Αλλαγή Νουκλεοτιδίου	Αλλαγή Αμινοξέος	Περίπτωση Δείκτης (Σύνολο)	%	Τύπος Μετάλλαξης	Πρώτη Αναφορά στην Ελλάδα
Υποκινητής	Del45T	(FH Pyrgos)	1 (3)	0.55	Έλλειψη	Ναι
2	81 T>G	C6W (p.C27W) FH San Fransisco	9 (9)	4.9	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
5	761 A>C	Q233P (p.Q245P) FH Reggio Emilia-2	1 (1)	0.55	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
6	858 C>A	S265R (p.S286R) FH Greece-2	7 (7)	3.8	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
8	1150 C>T	Q363X (p.Q384X) FH Cyprus 2	1 (3)	0.55	Ανερμηνεύσιμη	Όχι
	1151 A>G	Q363P (p. Q384P) FH Dutch	1 (1)	0.55	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
	1158 C>G	D365E (p.D386E) FH Cyprus 2	1(3)	0.55	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
	1171 G>A	A370T (p.A391T) FH Afrikaner-1	7 (7)	3.8	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
9	1285 G>A	V408M (p. V429M) FH Afrikaner-2	18 (22)	9.9	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
	1291 G>A	A410T (p.A431T) FH Algerian-2	1 (1)	0.55	Παρερμηνεύσιμη	Ναι
11	1618 G>A	A519T (p.A540T)	1 (2)	0.55	Παρερμηνεύσιμη	Ναι
	1646 G>A	G528D (p.G549D) FH Genoa Palermo	15 (17)	8.2	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
	1706-10 G>A	Splice Site	1 (1)	0.55	Splice site	Ναι
12	1775 G>A	G571E (p.G592E) FH Sicily	1 (1)	0.55	Παρερμηνεύσιμη	Όχι
14	2043 G>A	C660X (p.C681X) FH Lebanese	1 (1)	0.55	Ανερμηνεύσιμη	Όχι
	2140+5 G>A	Splice Site	4 (6)	2.2	Splice site	Όχι
	2140+9 C>T					



Εικόνα 3.5. Γεωγραφική κατανομή των τεσσάρων πιο συχνών μεταλλάξεων του *LDLR* στον Ελληνικό πληθυσμό.

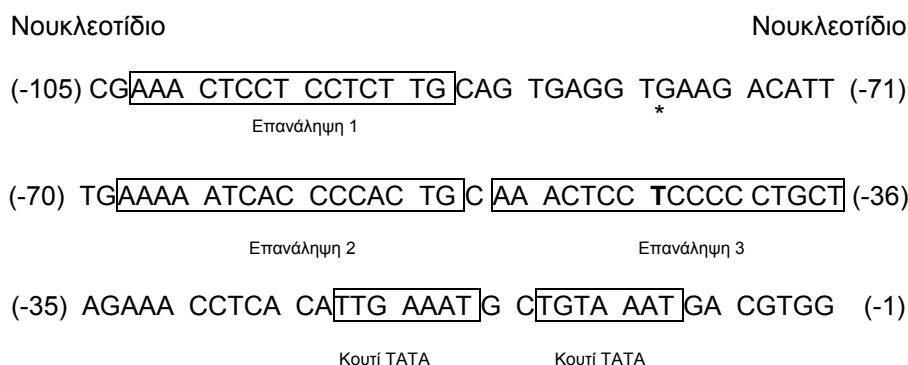
3.4 Μελέτη της νέας μετάλλαξης -45delT

3.4.1 Γενετική ανάλυση και οικογενειακό ιστορικό

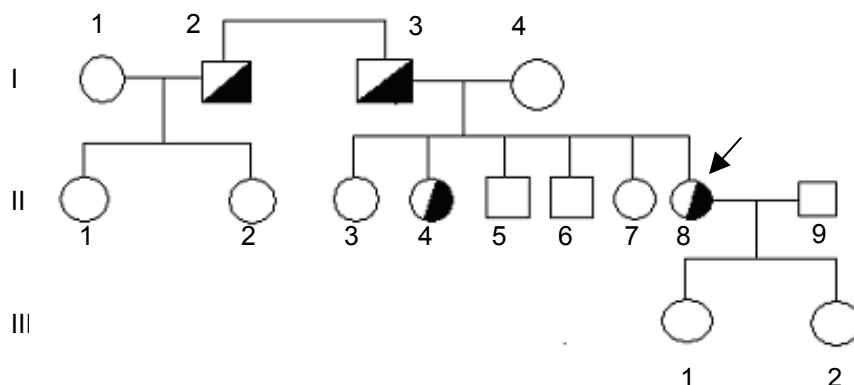
Μία από τις μεταλλάξεις που βρέθηκαν είναι η -45delT, στον υποκινητή του *LDLR*, η οποία αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα και τον κόσμο. Η μετάλλαξη ονομάστηκε FH Pyrgos λόγω της καταγωγής της ασθενούς. Η ανάλυση DGGE έδειξε άγνωστο πρότυπο για τον υποκινητή του *LDLR* (**Εικόνα 3.2.i.a**) και η ανάγνωση της πρωτοδιάταξης αποκάλυψε την έλλειψη μιας βάσης T στην θέση -45 (**Εικόνα 3.3.i**). Στην **Εικόνα 3.6** παρουσιάζεται η αλληλουχία του υποκινητή του *LDLR*. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε και με πέψη με την περιοριστική

ενδονουκλεάση *Mnl* I η οποία κόβει το φυσιολογικό αλληλόμορφο σε 2 ζώνες 42 και 9 bp ενώ η ύπαρξη μετάλλαξης καταργεί το σημείο κοπής (**Εικόνα 3.3.ii**). Ανάλυση 200 φυσιολογικών μαρτύρων με την μέθοδο της πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση έδειξε ότι κανείς δεν έφερε την μετάλλαξη.

Από τη μελέτη του γενεαλογικού δέντρου της ασθενούς (**Εικόνα 3.7**) προκύπτει οικογενειακό ιστορικό υπερλιπιδαιμίας. Δύο ακόμη μέλη της οικογένειας, η αδερφή (II4) και ο πατέρας (I2) της ασθενούς ήταν φορείς της μετάλλαξης (**Εικόνα 3.3.ii**). Ο I2 είναι επίσης πιθανός φορέας της μετάλλαξης καθώς κατά δήλωση έχει υπερχοληστερολαιμία, η ύπαρξή της όμως δεν επιβεβαιώθηκε καθώς δεν έδωσε ενυπόγραφη συγκατάθεση για γενετική ανάλυση. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της οικογένειας, για όποια μέλη, ήταν διαθέσιμα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.5**. Ο πατέρας της ασθενούς (I3) είχε φαινότυπο FH και είχε υποβληθεί σε επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης στην ηλικία των 70.



Εικόνα 3.6. Η αλληλουχία του υποκινητή του *LDLR*. Οι ρυθμιστικές περιοχές του υποκινητή σημειώνονται με κουτιά και η θέση της έλλειψης με αστερίσκο πάνω από την αλληλουχία.



Εικόνα 3.7. Γενεαλογικό δέντρο της ασθενούς στην οποία βρέθηκε η μετάλλαξη -45delT. Τα μέλη τα οποία φέρουν την μετάλλαξη παρουσιάζονται με μισοσκιασμένα σύμβολα.

Πίνακας 3.5. Κλινικά χαρακτηριστικά των μελών της οικογένειας στην οποία βρέθηκε η μετάλλαξη -45delT. Η παρουσία χαρακτηριστικού συμβολίζεται με 1 και η απουσία με 0, 0: γυναίκα, 1: άνδρας. Όλες οι τιμές λιπιδίων εκφράζονται ως mg/dL και είναι πριν την έναρξη θεραπείας.

Μέλος	Ηλικία	Φύλο	CAD	TC	LDL-C	HDL-C	TG	Apo-AI	Apo-B	Lp (a)
I-1	64	0	0							
I-2	70	1	1							
I-3	74	1	1	260	195	32	166	132	138	20
I-4	65	0	0	251	176.2	50	124	162	145	29
II-1		0	0							
II-2		0	0							
II-3	38	0	0							
II-4	44	0	0	315	256	44	65	151	235	28
II-5	40	1	0	210	146	45	95	128	89	15
II-6	39	1	0	287	179.2	90	89	200	175	29
II-7	36	0	0	204	137	59	38	172	86	15
II-8	33	0	0	335	276	49	47	169	251	29
III-1	17	0	0							
III-2	14	0	0							

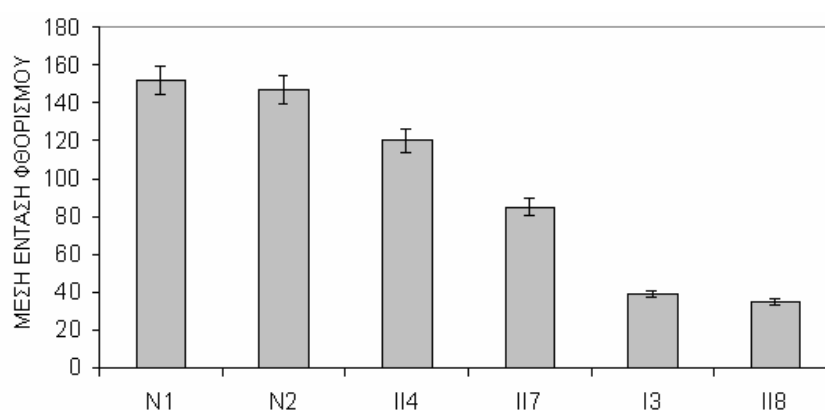
3.4.2 Η μετάλλαξη -45delT επηρεάζει την έκφραση και τη λειτουργικότητα του LDL-R

Η ικανότητα του LDL-R να προσλαμβάνει LDL μελετήθηκε με πειράματα πρόσδεσης και πρόσληψης Dil-LDL. Μονοπύρηνια απομονωμένα από μέλη της οικογένειας καλλιεργήθηκαν παρουσία Dil-LDL. Η πρόσδεση και η πρόσληψη, συγκρίνοντας με φυσιολογικούς μάρτυρες, ήταν στην ασθενή 24% και στην αδερφή της (II7) 56%. Το ποσοστό αυτό υποδεικνύει ότι παρά το ότι η II7 δεν φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να έχει κάποια άλλη μετάλλαξη που να επηρεάζει την λειτουργικότητα του LDL-R. Στον πατέρα (I3) η πρόσδεση ήταν 26%. Στην αδερφή της ασθενούς (II4) η πρόσδεση ήταν 80%, ποσοστό που πιθανό να οφείλεται στη υπολιπιδαιμική θεραπεία που ακολουθούσε τα τελευταία 3 χρόνια (**Εικόνα 3.8**).

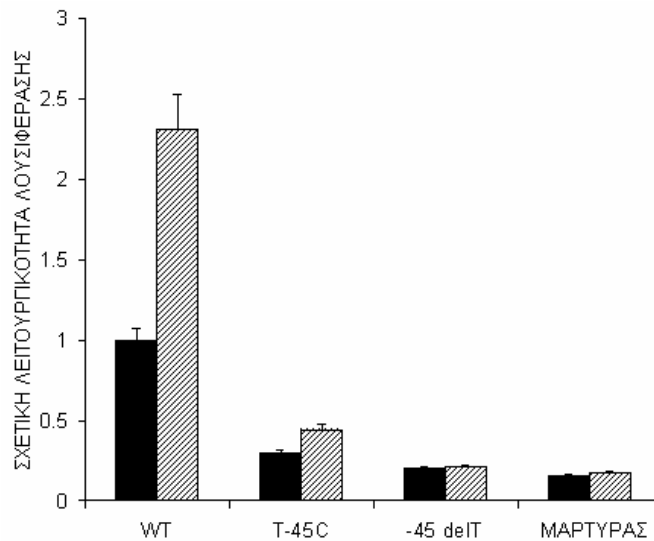
Η λειτουργικότητα του υποκινητή του *LDLR* μελετήθηκε με τη δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου το οποίο περιείχε τμήμα του υποκινητή 595bp και επιμόλυνση σε κύτταρα HepG2. Χρησιμοποιήθηκαν αρνητικός μάρτυρας (πλασμίδιο χωρίς αλληλουχία υποκινητή), πλασμίδιο με υποκινητή φυσικού τύπου και πλασμίδιο με υποκινητή με νουκλεοτιδική αντικατάσταση (-45 T>C) στην ίδια θέση που έχει δείχθει να μειώνει την έκφραση του *LDLR* σε κύτταρα COS (Sun et al., 1995).

Σε κύτταρα που καλλιιεργήθηκαν παρουσία ορού το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο -45delT παρουσίασε έκφραση λουσιφεράσης $5.0 \pm 0.8\%$ (μέση τιμή $\pm$ τυπικό λάθος μέσου από 8 επαναλήψεις) σε σύγκριση με τον υποκινητή φυσικού τύπου, τιμή που ήταν χαμηλότερη και από αυτή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου -45 T>C (14.8 ± 1.6). Όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με καλλιιεργητικό υλικό απουσία ορού η έκφραση της λουσιφεράσης στο πλασμίδιο φυσικού τύπου και στο -45 T>C αυξήθηκε περίπου κατά 2.3 και 1.5 φορές, αντίστοιχα. Αντίθετα, στο πλασμίδιο -45delT δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση στην έκφραση ($1.4 \pm 0.5\%$ πάνω από τον μάρτυρα σε σύγκριση με τον υποκινητή φυσικού τύπου) (**Εικόνα 3.9**).

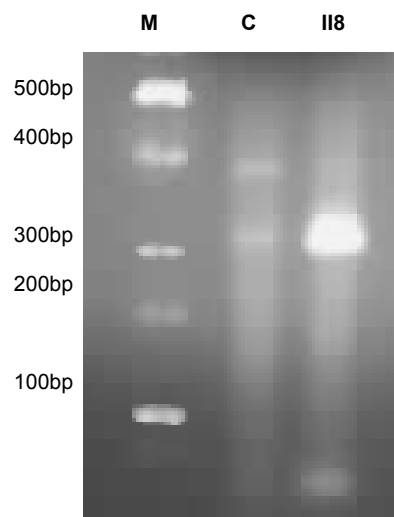
Επιπλέον, απομονώθηκε RNA από την ασθενή και φυσιολογικό μάρτυρα το οποίο πολλαπλασιάστηκε με RT-PCR για την περιοχή των εξονίων 12-13 όπου εμπεριέχεται ο πολυμορφισμός *Hinc* II. Μετά από ανάλυση PCR και πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hinc* II βρέθηκε ότι ο φυσιολογικός μάρτυρας και η ασθενής ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό. Η πέψη των προϊόντων της RT-PCR με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση έδειξε ότι ενώ ο μάρτυρας είχε ίση ποσότητα των δύο αλληλομόρφων *Hinc* II+ και *Hinc* II-, η ασθενής παρουσίασε μόνο τη ζώνη που αντιστοιχούσε στο αλληλόμορφο *Hinc* II+, υποδηλώνοντας ότι το mRNA που προέρχεται από το αλληλόμορφο *Hinc* II- υπολείπεται. Η μείωση της δραστηριότητας του υποκινητή του *LDLR* στην ασθενή οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου, το οποίο απουσιάζει στην ανάλυση των προϊόντων της RT-PCR, στο 5% (**Εικόνα 3.10**).



Εικόνα 3.8. Μέση ένταση φθορισμού της Dil-LDL σε μονοκύτταρα, απομονωμένα από διαφορετικά μέλη της οικογένειας με τη μετάλλαξη -45delT, διεγερμένα με φυτοαιμοσυγκολητίνη. Τα άτομα N1 και N2 είναι φυσιολογικοί μάρτυρες.



Εικόνα 3.9. Ανάλυση της λειτουργικότητας υποκινητή *LDLR* φυσικού τύπου (WT) και μεταλλαγμένου. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιέχουν τις φυσιολογικές ή μεταλλαγμένες αλληλουχίες κλωνοποιήθηκαν σε πλασμίδιο pGL3 και χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας χωρίς αλληλουχία υποκινητή. Μετά την επιμόλυνση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία (μαύρες μπάρες) ή απουσία (γκρι μπάρες) 10% FBS. Η έκφραση εκτιμήθηκε μέσω της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές±τυπικό λάθος μέσου, και προέρχονται από 8 επαναλήψεις.



Εικόνα 3.10. Πέψη των προϊόντων της RT-PCR με *Hinc* II σε υγιή μάρτυρα (C) και στην ασθενή II8. Το προϊόν της RT-PCR έχει μέγεθος 393bp και περιέχει τμήματα των εξονίων 12 και 13. Στον υγιή μάρτυρα παρατηρούνται 3 ζώνες μεγέθους 393, 340 και 53bp, Στην ασθενή εμφανίζονται μόνο οι ζώνες 340 και 53bp. Η ύπαρξη της μετάλλαξης –45delT στον υποκινητή του *LDLR* παρεμποδίζει την έκφραση του ενός αλληλομόρφου έτσι η ζώνη 393bp δεν είναι ορατή στην ασθενή (II8).

3.5 Ο τύπος της μετάλλαξης στον *LDLR* επηρεάζει τον φαινότυπο της FH

Με το πέρας της γενετικής ανάλυσης οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες σύμφωνα με το είδος της μετάλλαξης που έφεραν. Οι μεταλλάξεις ορίστηκαν ως ελαττωματικού ή αρνητικού υποδοχέα, βάση των πληροφοριών στο <http://www.ucl.ac.uk/fh/> για την επίδραση των μεταλλάξεων στην λειτουργικότητα του LDL-R. Στην ομάδα ελαττωματικού υποδοχέα κατατάχθηκαν 15 ασθενείς ενώ στην ομάδα αρνητικού υποδοχέα 37 ασθενείς. Απλή ανάλυση με τεστ Mann Whitney έδειξε ότι η ομάδα αρνητικού υποδοχέα είχε υψηλότερα επίπεδα TC και LDL-C σε σχέση με την ομάδα ελαττωματικού υποδοχέα (333.3 ± 66.0 vs 298.3 ± 47.1 mg/dL, $p=0.08$ και 264.9 ± 60.8 vs 230.6 ± 45.8 mg/dL, $p=0.058$) (Πίνακας 3.6).

Λαμβάνοντας ως συμμεταβλητές την ηλικία, το φύλο και το BMI η ομάδα αρνητικού υποδοχέα συνέχισε να παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα TC και LDL-C σε σχέση με την ομάδα ελαττωματικού υποδοχέα ($p=0.044$ και $p=0.024$ αντίστοιχα) (Πίνακας 3.7).

Στη συνέχεια συγκρίθηκε η συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων (ΞΤ), γεροντότοξου (ΓΕ) και CAD ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η ύπαρξη ξανθωμάτων ήταν 6 φορές μεγαλύτερη στην ομάδα με μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα σε σύγκριση με την ομάδα με μετάλλαξη ελαττωματικού υποδοχέα ($OR=5.96$, $p=0.1$) (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.6. Σύγκριση των επιπέδων λιπιδίων μεταξύ ομάδων ελαττωματικού και αρνητικού υποδοχέα. Τα επίπεδα λιπιδίων παρουσιάζονται ως mg/dL (Μέση Τιμή $\pm$ TA). *Τα επίπεδα σημαντικότητας P παρουσιάζονται εφόσον πλησιάζουν το επίπεδο σημαντικότητας 0.05.

Δείκτης	Ελαττωματικού Υποδοχέα	Αρνητικού Υποδοχέα	P*
TC	298.3 $\pm$ 47.1	333.3 $\pm$ 66.0	0.08
LDL-C	230.6 $\pm$ 45.8	264.9 $\pm$ 60.8	0.058
HDL-C	47.7 $\pm$ 17.2	46.3 $\pm$ 14.7	-
TG	124.6 $\pm$ 70.4	116.5 $\pm$ 51.6	-
Apo-AI	143.8 $\pm$ 26.3	137.0 $\pm$ 54.8	-
Apo-B	181.7 $\pm$ 28.6	195.4 $\pm$ 52.6	-

Πίνακας 3.7. Η επίδραση του τύπου της μετάλλαξης του *LDLR* στα επίπεδα λιπιδίων. *Σε όλα τα μοντέλα έχει γίνει προσαρμογή για την ηλικία, το φύλο και το BMI. Τα επίπεδα σημαντικότητας P παρουσιάζονται εφόσον είναι <0.05.

Μοντέλο	Δείκτης	$\beta \pm SE$	P*	R ²
1	TC	-44.05±28.47	0.044	0.20
2	LDL-C	-39.05±26.02	0.024	0.23
3	HDL-C	-8.48±6.43	-	
4	TG	8.47±15.59	-	
5	Apo-AI	-2.29±8.36	-	
6	Apo-B	-10.55±22.89	-	

Πίνακας 3.8. Η επίδραση του τύπου της μετάλλαξης στον *LDLR* στη συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων (ΞΤ), γεροντότοξου (ΓΕ) και CAD. Έχει γίνει προσαρμογή για την *ηλικία, ** την ηλικία, το φύλο και το BMI.

Ομάδα	Παράγοντας	Συχνότητα	OR	95% CI	P
Ελαττωματικού	ΞΤ+	1/15	5.96	0.984-1.1	0.1*
Υποδοχέα	ΞΤ-	14/15			
Αρνητικού	ΞΤ+	10/36			
Υποδοχέα	ΞΤ-	26/36			
Ελαττωματικού	CAD+	2/15	0.11	0.335-32.35	0.307**
Υποδοχέα	CAD-	13/15			
Αρνητικού	CAD+	9/36			
Υποδοχέα	CAD-	27/36			
Ελαττωματικού	ΓΕ+	2/15	2.6	0.439-15.407	0.293*
Υποδοχέα	ΓΕ-	13/15			
Αρνητικού	ΓΕ+	9/36			
Υποδοχέα	ΓΕ-	26/36			

Ανάλογα, έγινε σύγκριση των επιπέδων λιπιδίων μεταξύ των ασθενών στους οποίους βρέθηκε μετάλλαξη και εκείνων που δεν βρέθηκε μετάλλαξη. Στην ομάδα με μετάλλαξη κατατάχθηκαν 65 ασθενείς και στην ομάδα χωρίς μετάλλαξη 80 ασθενείς. Ανάλυση με τεστ Mann Whitney έδειξε ότι η ομάδα χωρίς μετάλλαξη είχε υψηλότερα επίπεδα TC, LDL-C, και Apo-B σε σχέση με την ομάδα με μετάλλαξη (341.4±90.7 vs 331.5±77.0mg/dL, p=0.046, 267.6±88.9 vs 262.8±70.6mg/dL, p=0.017 και 198.7±61.6 vs 194.7±37.0mg/dL, p=0.001) (Πίνακας 3.9).

Λαμβάνοντας ως συµµεταβλητές την ηλικία, το φύλο και το BMI η οµάδα χωρίς µετάλλαξη παρουσίαζε µόνο υψηλότερα επίπεδα Apo-AI σε σχέση µε την οµάδα µε µετάλλαξη ($p=0.01$) (**Πίνακας 3.10**).

Στη συνέχεια συγκρίθηκε η συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων, γεροντότοξου και CAD ανάµεσα στις δύο οµάδες. Η εμφάνιση CAD ήταν 2 φορές µεγαλύτερη στην οµάδα µε µετάλλαξη στον *LDLR* σε σύγκριση µε την οµάδα χωρίς µετάλλαξη ($OR=2.03$, $p=0.14$) ενώ για τα ξανθώµατα δεν βρέθηκε καµία συσχέτιση (**Πίνακας 3.11**).

Πίνακας 3.9. Σύγκριση των επιπέδων λιπιδίων µεταξύ της οµάδας µε µετάλλαξη και της οµάδας χωρίς µετάλλαξη στον *LDLR*. Τα επίπεδα λιπιδίων παρουσιάζονται ως mg/dL (Μέση Τιμή±ΤΑ). *Τα επίπεδα σηµαντικότητας *P* παρουσιάζονται εφόσον πλησιάζουν το επίπεδο σηµαντικότητας 0.05.

Δείκτης	ΠΑΡΟΥΣΙΑ	ΑΠΟΥΣΙΑ	P*
	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ <i>LDLR</i>	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ <i>LDLR</i>	
TC	331.5±77.0	341.4±90.7	0.046
LDL-C	262.8±70.64	267.6±88.9	0.017
HDL-C	45.5±14.53	46.6±111.6	-
TG	141.0±82.4	135.0±90.5	-
Apo-AI	139.0±24.4	146.0±24.8	-
Apo-B	194.7±37.0	198.7±61.6	0.001

Πίνακας 3.10. Η επίδραση της ύπαρξης της µετάλλαξης στον *LDLR* στα επίπεδα λιπιδίων.

*Σε όλα τα μοντέλα έχει γίνει προσαρµογή για την ηλικία, το φύλο και το BMI. Τα επίπεδα σηµαντικότητας *P* παρουσιάζονται εφόσον είναι <0.05.

Μοντέλο	Δείκτης	β±SE	P*	R ²
1	TC	24,4±13.53	-	-
2	LDL-C	-14.6±13.23	-	-
3	HDL-C	2.49±2.07	-	-
4	TG	5.01±23.25	-	-
5	Apo-AI	10.72±4.16	0.01	0.159
6	Apo-B	7.92±9.15	-	-

Πίνακας 3.8. Η επίδραση της ύπαρξης μετάλλαξης στον *LDLR* στη συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων (ΞΤ), γεροντότοξου (ΓΕ) και CAD. Έχει γίνει προσαρμογή για την *ηλικία, ** την ηλικία, το φύλο και το BMI.

Ομάδα	Παράγοντας	Συχνότητα	OR	95% CI	P
Απουσία	ΞΤ+	19/80	1.13	0.51-2.51	0.75*
Μετάλλαξης	ΞΤ-	71/80			
Παρουσία	ΞΤ+	13/62			
Μετάλλαξης	ΞΤ-	49/62			
Απουσία	CAD+	12/94	2.03	0.78-5.25	0.14**
Μετάλλαξης	CAD-	82/94			
Παρουσία	CAD+	13/62			
Μετάλλαξης	CAD-	49/62			
Απουσία	ΓΕ+	16/75	0.93	0.40-2.15	0.88*
Μετάλλαξης	ΓΕ-	59/75			
Παρουσία	ΓΕ+	13/65			
Μετάλλαξης	ΓΕ-	49/65			

3.6 Ο γονότυπος της *ApoE* δεν επηρεάζει το φαινότυπο της FH

Σε 104 από τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τον γονότυπο της *ApoE*. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.12**. Δεκατρία άτομα είχαν υπέρταση και CAD ενώ 57 άτομα είχαν μετάλλαξη στον *LDLR*. Οι γονότυποι και η συχνότητα των αλληλομόρφων παρουσιάζεται στον **πίνακα 3.13**. Τα αλληλόμορφα E2, E3 και E4 είχαν συχνότητα 0.06, 0.86 και 0.09 αντίστοιχα. Δεν υπήρχε απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Για την ανάλυση της επίδρασης του γονότυπου της *ApoE* στα επίπεδα λιπιδίων και την εμφάνιση CAD έγινε ομαδοποίηση των ατόμων με βάση την ύπαρξη των αλληλομόρφων 3 (E2E3, E3E3) και 4 (E3E4, E4E4).

Στον **Πίνακα 3.14** παρουσιάζονται τα επίπεδα λιπιδίων ως προς τον γονότυπο *ApoE* και όπως φαίνεται δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων E3 και E4. Σε περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ως συμμεταβλητές η ηλικία και το φύλο στη μια περίπτωση και η ηλικία, το φύλο και το BMI στην άλλη. Κανένας από τους δείκτες που μελετήθηκαν στα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (**Πίνακας 3.15**).

Στον **Πίνακα 3.16** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογαριθμικής παλινδρόμησης για την επίδραση του γονότυπου της *ApoE* στην συχνότητα

εμφάνισης CAD και υπέρτασης, χρησιμοποιώντας την ηλικία και το φύλο ως συμμεταβλητές. Όπως φαίνεται το αλληλομόρφου E4 δεν επηρεάζει την εμφάνιση της CAD και υπέρτασης.

Πίνακας 3.12. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών στους οποίους έγινε ανάλυση γονότυπου *ApoE*. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ TA.

Αριθμός Ασθενών	104
Φύλο Άντρες/ Γυναίκες	60/44
Ηλικία (years)	40.8 $\pm$ 13.2
BMI (kg/m ²)	24.79 $\pm$ 3.43
Υπέρταση	13/104
CAD	13/104
Ξανθώματα Τενόντων	12/104
Γεροντότοξο	14/104
TC (mg/dL)	333.37 $\pm$ 75.28
LDL-C (mg/dL)	260.90 $\pm$ 67.2
HDL-C (mg/dL)	45.7 $\pm$ 14.19
TG (mg/dL)	120.61 $\pm$ 57.56
Apo-AI (mg/dL)	140.29 $\pm$ 24.5
Apo-B (mg/dL)	192.87 $\pm$ 42.80
Μετάλλαξη <i>LDLR</i>	57/104

Πίνακας 3.13. Γονότυποι και συχνότητα των αλληλομόρφων της *ApoE* στους ασθενείς με FH.

Γονότυπος	Αριθμός Ασθενών (n=104)
E2E2	0
E2E3	12
E3E3	75
E3E4	34
E2E4	0
E4E4	1
Αλληλόμορφο	Συχνότητα
E2	0.06
E3	0.86
E4	0.09

Πίνακας 3.14. Επίπεδα λιπιδίων (mg/dL) (Μέση Τιμή±ΤΑ) μεταξύ των ομάδων E3 και E4. Τα επίπεδα σημαντικότητας P δεν πλησίασαν το επίπεδο σημαντικότητας 0.05 για κανένα δείκτη.

Δείκτης	E2E3/E3E3	E3E4/E4E4	P*
TC	329.3±78.2	341.8±74.2	-
LDL-C	261.0±71.1	260.2±44.4	-
HDL-C	45.8±14.6	45.06±11.87	-
TG	121.7±57.9	114.8±56.94	-
Apo-AI	139.4±25.0	144.4±22.3	-
Apo-B	193.7±43.5	188.6±40.5	-

Πίνακας 3.15. Η επίδραση του γονότυπου *ApoE* στα επίπεδα λιπιδίων. Σε όλα τα μοντέλα έχει γίνει προσαρμογή *για την ηλικία και το φύλο, ** την ηλικία, το φύλο και το BMI. Τα επίπεδα σημαντικότητας P δεν πλησίασαν για κανένα δείκτη το 0.05

Μοντέλο	Δείκτης	β±SE*	P*	β±SE**	P**
1	TC	-12.0±22.21	-	-15.39±22.1	-
2	LDL-C	0.378±19.42	-	-1.01±19.77	-
3	HDL-C	1.031±3.943	-	1.24±4.01	-
4	TG	0.371±15.84	-	10.51±15.27	-
5	Apo-AI	-3.83±7.36	-	-2.95±7.91	-
6	Apo-B	4.46±13.39	-	9.06±14.06	-

Πίνακας 3.16. Η επίδραση του γονότυπου *ApoE* στη συχνότητα εμφάνισης CAD και υπέρτασης.

Γονότυπος	Παράγοντας	Συχνότητα	OR	95% CI	P
E2E3/E3E3	CAD+	12	0.43	0.05-3.70	0.44
	CAD-	63			
E3E4/E4E4	CAD+	1			
	CAD-	14			
E2E3/E3E3	Υπέρταση +	12	0.46	0.05-3.99	0.48
	Υπέρταση -	65			
E3E4/E4E4	Υπέρταση +	1			
	Υπέρταση -	14			

3.7 Πολυμορφισμοί σε 5 γονίδια επηρεάζουν τα επίπεδα της Apo-B

Πολυμορφισμοί σε πέντε γονίδια PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G βρέθηκαν να επηρεάζουν τα επίπεδα της Apo-B. Η γενετική ανάλυση για τους πολυμορφισμούς πραγματοποιήθηκε σε 84 ασθενείς. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που αναλύθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.17**.

Οι γονότυποι και η κατανομή των αλληλομόρφων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.18**. Δεν υπήρχε απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Δεκαπέντε ασθενείς παρουσίαζαν CAD και 12 υπέρταση, ενώ σε 52 άτομα είχε βρεθεί μετάλλαξη στον *LDLR* (**Πίνακας 3.17**).

Στον **Πίνακα 3.19** παρουσιάζονται τα επίπεδα λιπιδίων σύμφωνα με τους γονότυπους για τους 5 πολυμορφισμούς. Για τον πολυμορφισμό PON-2 Ser311Cys, τα άτομα που έφεραν το αλληλόμορφο Cys είχαν υψηλότερα επίπεδα TC, LDL-C και Apo-B σε σχέση με τους ομοζυγώτες Ser/Ser (358.91 ± 94.63 vs $316.47 \pm 52 \text{ mg/dL}$, $p=0.06$; 281.42 ± 81.12 vs $242.56 \pm 56.10 \text{ mg/dL}$, $p=0.04$; 203.74 ± 41.79 vs $180.93 \pm 36.10 \text{ mg/dL}$, $p=0.02$, αντίστοιχα). Υψηλότερα επίπεδα Apo-B είχαν επίσης οι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο Asn στη θέση 291 της LPL σε σύγκριση με τους ετεροζυγώτες Asn/Ser (193.10 ± 39.70 vs $132.50 \pm 12.02 \text{ mg/dL}$, $p=0.04$).

Για τους ασθενείς με το αλληλόμορφο T στη θέση 11053 του γονιδίου PAI, παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα Apo-B. Για τους ετεροζυγώτες TG και τους ομοζυγώτες TT τα επίπεδα Apo-B ήταν $204.0 \pm 35.2 \text{ mg/dL}$ και 192.22 ± 37.50 αντίστοιχα, ενώ στους GG ομοζυγώτες ήταν $170.77 \pm 41.84 \text{ mg/dL}$ ($p=0.03$).

Η ανάλυση για τον πολυμορφισμό G-455A στο γονίδιο FGB έδειξε ότι οι φορείς του G αλληλομόρφου είχαν υψηλότερα επίπεδα Apo-B. Στους ετεροζυγώτες AG ήταν 194.80 ± 36.47 και στους ομοζυγώτες GG homozygotes $137.93 \pm 48.98 \text{ mg/dL}$ σε σχέση με τους AA ομοζυγώτες 14.0 mg/dL ($p=0.05$).

Τέλος, για τον πολυμορφισμό NOS A-922G, οι φορείς του αλληλομόρφου A είχαν υψηλότερα επίπεδα Apo-B, οι ετεροζυγώτες AG $211.26 \pm 33.23 \text{ mg/dL}$ και οι AA 194.82 ± 31.04 σε σύγκριση με τους GG ομοζυγώτες $175.31 \pm 41.57 \text{ mg/dL}$ ($p=0.006$).

Η επίδραση κάθε πολυμορφισμού στα επίπεδα λιπιδίων εκτιμήθηκε και με μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας ως συμμεταβλητές την ηλικία και το φύλο (**Πίνακας 3.20**). Μεταξύ των δεικτών που εξετάστηκαν συμπεριλαμβανομένων TC, LDL-C, HDL-C, TG, Apo-AI και Apo-B, οι διαφορές στα επίπεδα Apo-B ήταν στατιστικά σημαντικές για τους πολυμορφισμούς LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G ($p=0.046$, $p=0.04$, $p=0.02$, $p=0.005$ αντίστοιχα). Επιπλέον, ο πολυμορφισμός PON-2 Ser311Cys επηρεάζει την TC και LDL-C ($p=0.03$, $p=0.02$ αντίστοιχα) (**Πίνακας 3.20**).

Πίνακας 3.17. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με FH στους οποίους έγινε ανάλυση για τους πολυμορφισμούς PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ ΤΑ.

Αριθμός Ασθενών	84
Φύλο Άντρες/ Γυναίκες	55/ 29
Ηλικία (years)	41.4 $\pm$ 16.2
BMI (kg/m ²)	24.14 $\pm$ 3.45
Υπέρταση	12/84
CAD	15/84
Ξανθώματα Τενόντων	13/84
Γεροντότοξο	11/84
TC (mg/dL)	330.1 $\pm$ 83.7
LDL-C (mg/dL)	254.8 $\pm$ 74.6
HDL-C (mg/dL)	48.7 $\pm$ 16.0
TG (mg/dL)	119.2 $\pm$ 54.0
Apo-AI (mg/dL)	141.3 $\pm$ 23.7
Apo-B (mg/dL)	187.2 $\pm$ 44.71
Μετάλλαξη <i>LDLR</i>	52/84

Πίνακας 3.18. Γονότυποι και συχνότητα αλληλομόρφων για τους πολυμορφισμούς PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G που μελετήθηκαν σε 84 ασθενείς με FH.

Πολυμορφισμός	Αριθμός Ασθενών
PON-2 Ser311Cys	
Ser/Ser	37
Cys/Ser	32
Cys/Cys	10
Συχνότητα Αλληλομόρφου (Cys/Ser)	(0.33/0.67)
LPL Asn291Ser	
Asn/Asn	78
Asn/ Ser	3
Ser/Ser	0
Συχνότητα Αλληλομόρφου (Asn/Ser)	(0.98/0.02)
PAI-1 T11053G	
TT	22
GT	34
GG	25
Συχνότητα Αλληλομόρφου (G/T)	(0.48/0.52)
FGB G-455A	
GG	57
AG	19
AA	3
Συχνότητα Αλληλομόρφου (G/A)	(0.84/0.16)
NOS A-922G	
AA	20
AG	41
GG	23
Συχνότητα Αλληλομόρφου (A/G)	(0.48/0.52)

Πίνακας 3.19. Επίπεδα λιπιδίων (mg/dL) (Μέση Τιμή±ΤΑ) μεταξύ των ομάδων σύμφωνα με τους γονότυπους για τους πολυμορφισμούς PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G. Τα επίπεδα σημαντικότητας P παρουσιάζονται εφόσον πλησιάζουν το 0.05.

PON-2 Ser311Cys	Cys/Cys, Cys/Ser	Ser/Ser	P*	
TC	358.91±94.63	316.47±52	0.06	
LDL-C	281.42±81.12	242.56±56.10	0.04	
HDL-C	48.14±16.80	46.25±13.61	-	
TG	126.58±58.94	120.22±53.61	-	
Apo-AI	137.03±23.02	141.22±24.26	-	
Apo-B	203.74±41.79	180.93±36.10	0.02	
LPL Asn291Ser	Asn/Asn	Asn/Ser	P*	
TC	338.90±80.81	301.66±45.08	-	
LDL-C	264.28±73.32	239.33±37.54	-	
HDL-C	47.51±15.41	43.66±6.11	-	
TG	125.20±56.15	93.33±42.77	-	
Apo-AI	140.18±23.40	121.00±1.41	-	
Apo-B	193.10±39.70	132.50±12.02	0.04	
PAI-1 T11053G	GG	TG	TT	P**
TC	313.40±44.35	334.95±74.82	349.96±98.98	-
LDL-C	146.60±44.07	267.56±74.16	267.42±84.96	-
HDL-C	44.64±11.27	48.78±19.07	47.27±14.52	-
TG	106.05±47.67	136.78±64.88	122.44±48.76	-
Apo-AI	139.11±17.15	136.52±29.68	141.22±21.08	-
Apo-B	170.77±41.84	204.00±35.20	192.22±37.50	0.03
FGB G-455A	GG	AG	AA	P**
TC	347.78±73.69	331.01±82.16	315.33±57.27	-
LDL-C	269.36±51.88	259.73±78.18	225.50±20.50	-
HDL-C	47.89±16.32	46.66±15.14	46.00±4.24	-
TG	70.00±16.97	136.58±57.46	120.64±55.53/	-
Apo-AI	143.00±19.43	137.72±24.99	138.00±5.65	-
Apo-B	186.35±42.99	194.80±36.47	115.00±9.89	0.05
NOS A-922G	AA	AG	GG	P**
TC	340.31±59.76	332.83±94.70	332.00±56.77	-
LDL-C	273.75±57.21	256.69±80.01	257.98±61.42	-
HDL-C	42.36±10.64	50.28±15.29	45.52±17.31	0.07
TG	132.05±58.52	116.46±51.68	124.42±58.18	-
Apo-AI	134.58±22.91	142.62±20.58	140.10±28.84	-
Apo-B	194.82±31.04	211.26±33.23	175.31±41.57	0.006

Πίνακας 3.20. Η επίδραση των πολυμορφισμών PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G στα επίπεδα λιπιδίων. Σε όλα τα μοντέλα έχει γίνει προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο. Τα επίπεδα σημαντικότητας P παρουσιάζονται εφόσον πλησιάζουν το 0.05.

Δείκτης	PON-2 Ser311Cys			LPL Asn291Ser			PAI-1 T11053G			FGB G-455A			NOS A-922G		
	$\beta \pm SE$	P	R ²	$\beta \pm SE$	P	R ²	$\beta \pm SE$	P	R ²	$\beta \pm SE$	P	R ²	$\beta \pm SE$	P	R ²
TC	41.34 $\pm$ 18.65	0.03	0.05	49.14 $\pm$ 48.52	-	-	15.93 $\pm$ 23.77	-	-	-14.03 $\pm$ 21.82	-	-	6.73 $\pm$ 23.46	-	-
LDL-C	38.64 $\pm$ 17.03	0.02	0.096	38.83 $\pm$ 43.74	-	-	-3.6 $\pm$ 21.65	-	-	-7.5 $\pm$ 19.48	-	-	4.51 $\pm$ 21.07	-	-
HDL -C	0.65 $\pm$ 3.67	-	-	4.45 $\pm$ 9.12	-	-	5.35 $\pm$ 4.53	-	-	-0.146 $\pm$ 4.11	-	-	-1.77 $\pm$ 4.48	-	-
TG	12.31 $\pm$ 13.43	-	-	22.16 $\pm$ 33.6	-	-	-21.57 $\pm$ 16.52	-	-	-19.58 $\pm$ 14.72	-	-	-1.4 $\pm$ 16.45	-	-
Apo-AI	-5.17 $\pm$ 6.12	-	-	19.16 $\pm$ 17.02	-	-	-0.28 $\pm$ 7.73	-	-	-4.59 $\pm$ 7.29	-	-	2.32 $\pm$ 7.68	-	-
Apo-B	26.58 $\pm$ 10.24	0.01	0.11	60.19 $\pm$ 29.45	0.046	0.07	11.3 $\pm$ 12.59	0.04	0.11	7.15 $\pm$ 11.8	0.02	0.134	40.59 $\pm$ 12.05	0.005	0.167

3.8 Πολυμορφισμός στο γονίδιο ANP επηρεάζει τα επίπεδα της Apo-AI και της HDL-C αλλά όχι τη συχνότητα εμφάνισης CAD

Σε 83 ασθενείς περιπτώσεις δείκτες έγινε ανάλυση για τους πολυμορφισμούς ANP T2238C και G664A. Τα κλινικά χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.21**. Η συχνότητα για κάθε αλληλόμορφο παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.22** και δεν υπήρχε απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg. Με τεστ Mann-Whitney μεταξύ των ομάδων ανάλογα με το γονότυπο φάνηκε ότι οι ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό G664A είχαν χαμηλότερα επίπεδα TC, LDL-C, HDL-C και Apo-AI σε σχέση με τους ομοζυγώτες GG (**Πίνακας 3.23**).

Πίνακας 3.21. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών στους οποίους έγινε ανάλυση για τους πολυμορφισμούς ANP T2238C και G664A. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές $\pm$ ΤΑ.

Αριθμός Ασθενών	83
Φύλο Άντρες/ Γυναίκες	46/37
Ηλικία (years)	41.2 $\pm$ 14.4
BMI (kg/m ²)	24.75 $\pm$ 3.5
Υπέρταση	11/83
CAD	14/83
Ξανθώματα Τενόντων	12/83
Γεροντότοξο	12/83
TC (mg/dL)	310.0 $\pm$ 60.0
LDL-C (mg/dL)	238.5 $\pm$ 58.0
HDL-C (mg/dL)	42.6 $\pm$ 21.3
TG (mg/dL)	142.6 $\pm$ 77.0
Apo-AI (mg/dL)	131.5 $\pm$ 19.85
Apo-B (mg/dL)	185.1 $\pm$ 38.6
Μετάλλαξη <i>LDLR</i>	46/83

Πίνακας 3.22. Γονότυποι και συχνότητα των αλληλομόρφων ANP T2238C και G664A σε ασθενείς με FH.

Πολυμορφισμός	Αριθμός Ασθενών
ANP T2238C	
T	57
TC	22
CC	2
Συχνότητα Αλληλομόρφου (T/C)	(0.84/0.26)
ANP G664A	
GG	76
AG	7
AA	0
Συχνότητα Αλληλομόρφου (G/A)	(0.96/0.04)

Στον **Πίνακα 3.24** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης με πολλαπλή παλινδρόμηση όπου έγινε προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο. Παρά το ότι η συσχέτιση του πολυμορφισμού G664A με την HDL-C ήταν οριακή ($p=0.08$), υπήρξε μεγάλη συσχέτιση με την Apo-AI καθώς οι ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό G664A είχαν χαμηλότερα επίπεδα Apo-AI ($p=0.015$) (**Πίνακα 3.24**). Για τον πολυμορφισμό T2238C δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα λιπιδίων μεταξύ των ομάδων, ακόμη και μετά την προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο.

Στον **Πίνακα 3.25** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογαριθμικής παλινδρόμησης για τη μελέτη της επίδρασης των πολυμορφισμών στην εμφάνιση CAD, μετά από προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών G664A και T2238C στην συχνότητα εμφάνισης CAD.

Πίνακας 3.23. Επίπεδα λιπιδίων (mg/dL) (Μέση Τιμή±ΤΑ) μεταξύ των ομάδων σύμφωνα με τους γονότυπους για τους πολυμορφισμούς ANP G664A και T2238C. Τα επίπεδα σημαντικότητας P παρουσιάζονται εφόσον πλησιάζουν το 0.05.

ANP G664A	GG	GA	P*
TC	340.6±79.3	277.8±40.8	0.03
LDL-C	266.7±71	210.4±45	0.03
HDL-C	48.1±15.4	37.2±5.9	0.05
TG	142.0±78	143.3±76.1	-
Apo-AI	141.4±23.6	121.7±16.1	0.02
Apo-B	193±40.2	177.2±37.0	-
ANP T2238C	TT	TC/CC	P*
TC	343.7±86.5	320.7±57.6	-
LDL-C	269.2±75.2	249.7±60.1	-
HDL-C	45.7±13.2	50±18.7	-
TG	127.5±58.8	176.1±294.7	-
Apo-AI	135.2±20.7	147.6±27.5	-
Apo-B	191.5±42.6	192.2±35.6	-

Πίνακας 3.24. Η επίδραση του πολυμορφισμού ANP G664A στα επίπεδα λιπιδίων. *Σε όλα τα μοντέλα έχει γίνει προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο. Τα επίπεδα σημαντικότητας P παρουσιάζονται εφόσον πλησιάζουν το 0.05.

Μοντέλο	Δείκτης	β±SE	P*	R²
1	TC	58.98±34.81	-	-
2	LDL-C	29.35±77.2	-	-
3	HDL-C	11.69±6.61	0.08	0.082
4	TG	48.78±31.32	-	-
5	Apo-AI	25.21±10.10	0.015	0.138
6	Apo-B	19.64±18.11	-	-

Πίνακας 3.25. Η επίδραση των γονότυπων ANP T2238C και G664A στη συχνότητα εμφάνισης CAD. *Έχει γίνει προσαρμογή για την ηλικία και το φύλο

Γονότυπος	Παράγοντας	Συχνότητα	OR	95% CI	P
G664G	CAD+	11	5.15	0.68-38.8	0.11
	CAD-	66			
G664A	CAD+	3			
	CAD-	5			
T2238T	CAD+	11	0.395	0.98-1.58	0.19
	CAD-	47			
T2238C/ C2238C	CAD+	3			
	CAD-	23			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Φάσμα *LDLR* μεταλλάξεων στον Ελληνικό πληθυσμό

Κατά τη διαδικασία ανίχνευσης μεταλλάξεων σε 183 ασθενείς με FH βρέθηκαν συνολικά 17 μεταλλάξεις, στον υποκινητή, στα εξόνια και στα όρια εξονίων/εσονίων του *LDLR*. Από τα 183 άτομα για τα οποία έγινε ανάλυση, βρέθηκαν μεταλλάξεις σε 67 ασθενείς και 11 συγγενείς τους (Dedoussis et al., 2004b).

Η πρώτη μελέτη στην Ελλάδα για τον προσδιορισμό του φάσματος των μεταλλάξεων στον *LDLR* έγινε το 1997 από την ομάδα των Mavroidis et al. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι σε αντίθεση με άλλους πληθυσμούς που είχαν μελετηθεί, στις μεταλλάξεις του γονιδίου του *LDLR* στην Ελλάδα δεν συμπεριλαμβάνονται μεγάλες ανακατατάξεις (Mavroidis et al., 1997, Hobbs et al., 1992). Η πιο συχνή μετάλλαξη ήταν η S265R (FH-Greece-2), που είχε πρωτοαναφερθεί από τους Hobbs et al., (Hobbs et al., 1992), σε Έλληνες του εξωτερικού και αναφέρθηκαν ακόμη οι C292X (FH Cyprus 1) και D280G (Mavroidis et al., 1997).

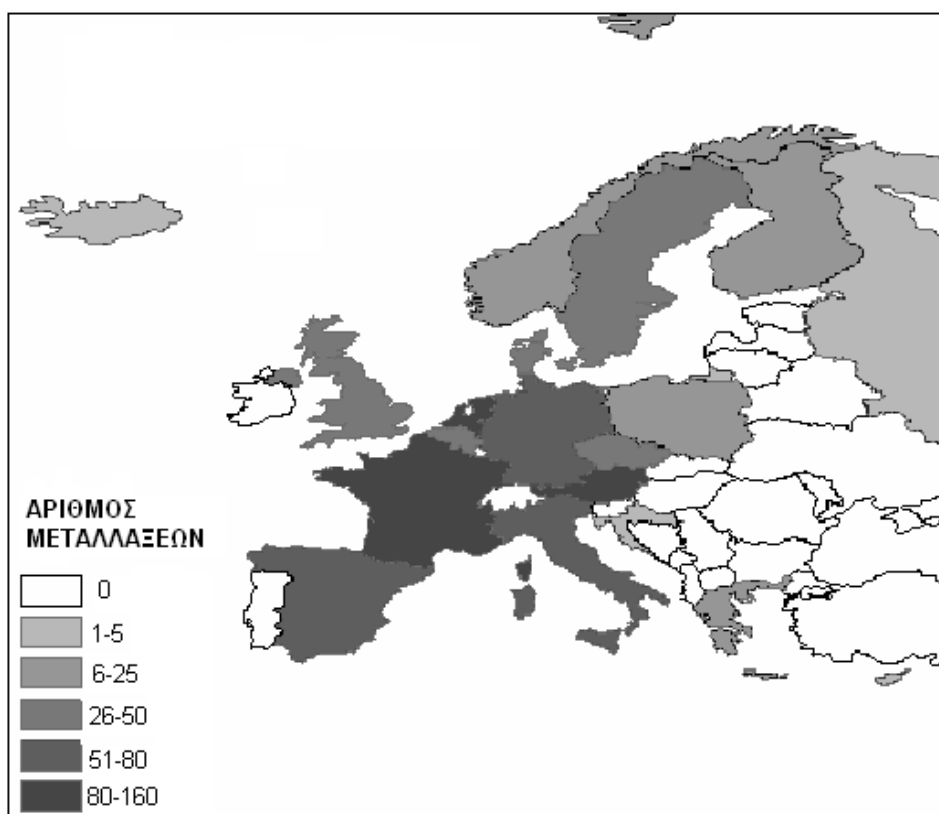
Η ίδια ομάδα ανέλυσε 150 ετερόζυγα παιδιά με FH για μεταλλάξεις στον *LDLR*. Στο δείγμα που μελετήθηκε, πέρα από τις μεταλλάξεις που είχαν προαναφερθεί, βρέθηκαν ακόμη άλλες τρεις, η C152R (FH Greece-1), η V408M (FH Afrikaner-2) και η G528D (FH Genoa Palermo) (Traeger-Synodinos et al., 1998). Σε επόμενες μελέτες ταυτοποιήθηκαν 3 νέες μεταλλάξεις, οι I430T, C6W και G571E, σε πληθυσμό της Ηπείρου (Miltiadous et al., 2000, Miltiadous et al., 2001).

Στην Κύπρο 3 μεταλλάξεις στον *LDLR* είναι υπεύθυνες για το 100% του φαινότυπου FH (Xenophontos et al., 2000). Η πιο συχνή μετάλλαξη C292X στο εξόνιο 6, με ποσοστό εμφάνισης 48%, είναι μια ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη, που είχε προηγουμένως βρεθεί σε 2 Κύπριους ασθενείς (Mavroidis et al., 1997, Traeger-Synodinos et al., 1998). Η δεύτερη συχνότερη μετάλλαξη, C660X, με ποσοστό εμφάνισης 30%, είναι επίσης ανερμηνεύσιμη και βρίσκεται στο εξόνιο 14, γνωστή και ως FH Lebanese. Η τρίτη με ποσοστό εμφάνισης 23% είναι διπλή μετάλλαξη Q363X; D365E στο εξόνιο 8, και βρέθηκε σε οικογένεια από την Κύπρο (Kotze et al., 1997). Σύμφωνα με τον αριθμό και τις συχνότητες των μεταλλάξεων, για το δείγμα των ασθενών που μελετήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής, είναι εμφανές ότι ο Ελληνικός πληθυσμός είναι πιο ομοιογενής σε σχέση με της Ιταλίας (Bertolini et al., 2000), της Ισπανίας (Mozas et al., 2000), της Γερμανίας (Dedoussis et al., 2004a, Nauck et al., 2001) και της Ολλανδίας (Fouchier et al., 2001), όπου ο μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων προσδίδει μεγάλη ετερογένεια.

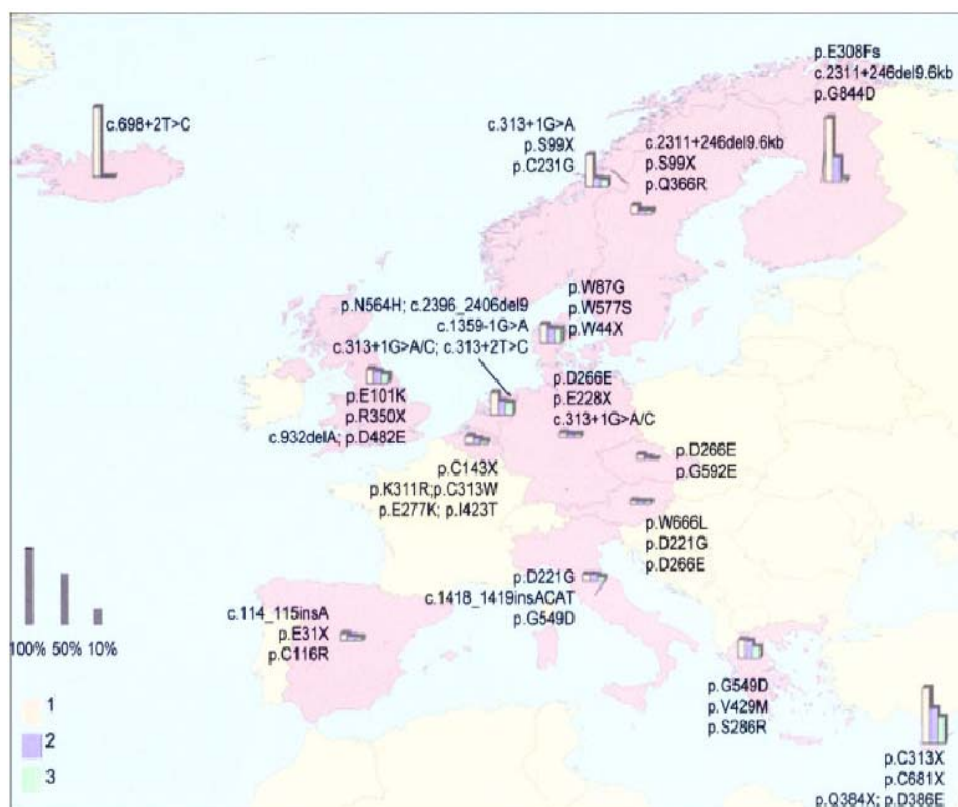
Παρόμοια εικόνα με τον Ελληνικό πληθυσμό έχουν και άλλοι όπως της Νορβηγίας και της Φιλανδίας όπου η νόσος οφείλεται σε λίγες μεταλλάξεις (Fouchier et al., 2001, Leren et al., 1997). Γενικότερα, ο αριθμός των παθογόνων μεταλλάξεων

στον *LDLR* ποικίλει ανάμεσα στις Ευρωπαϊκές χώρες (**Εικόνα 4.1**). Από την άλλη, υπάρχουν χώρες όπως η Ισλανδία όπου η FH οφείλεται σε μια μόνο μετάλλαξη. Στην **Εικόνα 4.2** παρουσιάζονται οι τρεις πιο συχνές μεταλλάξεις για κάθε χώρα. Κάποιες από αυτές είναι κοινές για τις διάφορες χώρες υποδηλώνοντας ίσως την προέλευσή τους από ένα κοινό πρόγονο.

Σε παλαιότερη μελέτη, έγινε προσπάθεια να υπολογιστεί ο αριθμός των γενεών που πέρασαν από τον κοινό πρόγονο από τον οποίο προήλθαν τέσσερις συχνές μεταλλάξεις του Ελληνικού πληθυσμού (Traeger-Synodinos et al, 1998). Για το σκοπό αυτό έγινε ανάλυση δύο πολυμορφικών μικροδορυφορικών αλληλουχιών στο χρωμόσωμα 19. Μια από τις δύο βρέθηκε να συνδέεται (in linkage disequilibrium) με τον *LDLR*. Στη συνέχεια, με τη χρήση εξίσωσης υπολογίστηκε ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του *LDLR* στην Ελλάδα έχουν προκύψει τα τελευταία 1000 χρόνια (Traeger-Synodinos et al, 1998). Σε αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται η ομοιογένεια που παρατηρήσαμε στον Ελληνικό πληθυσμό.



Εικόνα 4.1. Στον χάρτη της Ευρώπης παρουσιάζονται τα επίπεδα ετερογένειας ως προς τις μεταλλάξεις στον *LDLR*, με βάση τα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία.



Εικόνα 4.2. Στον χάρτη παρουσιάζονται οι τρεις πιο συχνές μεταλλάξεις για κάθε χώρα. Η ονοματολογία είναι σύμφωνα με τις οδηγίες του HUGO (www.HGVS.org/mutnomen/), ξεκινώντας από το νουκλεοτίδιο +1 (Α του ATG-κωδικόνιου μετάφρασης).

Από τις 17 μεταλλάξεις που βρήκαμε, οι τέσσερις, οι V408M, G528D, C6W και S265R, εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα. Το 73% των ασθενών με FH, ήταν φορείς για μια από αυτές τις μεταλλάξεις. Επιπλέον, οι παραπάνω συχνές μεταλλάξεις έδειξαν να παρουσιάζουν γεωγραφική κατανομή (Dedoussis et al., 2004b).

Το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων που αναφέρεται στην παρούσα μελέτη (43%) δεν απέχει από τα ποσοστά άλλων μελετών που έχουν για το ίδιο σκοπό (Ebhart et al., 1999). Γενικά, το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλάξεων για την FH, είτε σε ερευνητικό είτε σε διαγνωστικό επίπεδο, κυμαίνεται από 30-80% ανάλογα με τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση και την ευαισθησία της μεθόδου (Leren et al., 1997, Heath et al., 1999, Fouchier et al., 2001). Το ποσοστό που αναφέρουμε μπορεί να δικαιολογηθεί εν μέρει από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήσαμε. Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος DGGE είναι ένα σημαντικό “εργαλείο” για την ανίχνευση μεταλλάξεων δεν μπορεί να εντοπίσει όλες τις

μεταλλάξεις, πιθανόν λόγω της θέσης τους στο τμήμα που αναλύεται ή λόγω της γειτονικής αλληλουχίας του τμήματος που αναλύεται. Σε αυτές τις περιπτώσεις προτείνεται δεύτερος κύκλος αναλύσεων με διαφορετική μέθοδο πχ. DHPLC, που αυξάνει τις πιθανότητες εύρεσης μετάλλαξης (Bunn et al., 2002). Υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών που ενώ έχουν διαγνωστεί με FH δεν είναι δυνατή η εύρεση μετάλλαξης στο γονίδιο *ApoB*, ή στα εξόνια και στα όρια εξονίων/εσονίων του *LDLR*. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μπορεί η μετάλλαξη να βρίσκεται σε περιοχές του γονιδίου που δεν αναλύονται όπως τα εσόνια (Fischer et al., 1991, Schuster et al., 1991). Έτσι, είναι πιθανή η ύπαρξη μικρών ανακατατάξεων στα εσόνια του *LDLR* που επηρεάζουν την ωρίμανση (Copper et al., 1993, Webb et al., 1996, Amsellem et al., 1988) ή τη σταθερότητα του mRNA (Ross, 1988). Επιπλέον, πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν την πιθανή ύπαρξη μεταλλάξεων και σε άλλα γονίδια όπως το PCSK9 (Abifadel et al., 2003).

Η ομοιογένεια που παρατηρήσαμε στον Ελληνικό πληθυσμό, ως προς τις μεταλλάξεις στον *LDLR*, θέτει το ερώτημα για το αν είναι εφικτή και αναγκαία η εφαρμογή της γενετικής ανάλυσης, σε διαγνωστικό επίπεδο, στην Ελλάδα. Για να απαντηθεί το ερώτημα αυτό έχει σημασία να εκτιμηθεί η σημαντικότητα της γενετικής ανάλυσης, και τα οφέλη που προκύπτουν στις χώρες που ήδη εφαρμόζεται.

Για να εφαρμοστεί αλυσιδωτή γενετική εξέταση (cascade genetic screening) για μια ασθένεια, δηλαδή η εύρεση του πρώτου ασθενούς στην οικογένεια (περίπτωση δείκτης) και στη συνέχεια ο εντοπισμός συγγενών του με τον ίδιο γονότυπο, πρέπει να πληρούνται οι κανονισμοί του WHO (Wilson και Jungner 1968, Godard et al., 2003). Η FH είναι μια ασθένεια που πληρεί όλα τα κριτήρια του WHO και η αλυσιδωτή γενετική ανάλυση προτείνεται από όλους τους διεθνείς οργανισμούς όπως τον MEDPED (Williams et al., 1996) και την Ευρωπαϊκή Εταιρία Αθροσκήρυσης (Wood et al., 1998). Οι συγγενείς πρώτου βαθμού έχουν πιθανότητα 50 ή 100% να έχουν FH ανάλογα με το αν η περίπτωση δείκτης είναι ετεροζυγώτης ή ομοζυγώτης αντίστοιχα, και γίνεται ανάλυση για την ύπαρξη της ίδιας μετάλλαξης που έχει βρεθεί στην περίπτωση δείκτη.

Η αλυσιδωτή γενετική ανάλυση εφαρμόζεται σε αρκετές χώρες με την Ολλανδία και τη Νορβηγία να έχουν το πιο αναπτυγμένο σύστημα. Στην Ολλανδία που έχει και έναν από τους πιο ανομοιογενείς πληθυσμούς ως προς τον *LDLR*, έχει γίνει γενετική ανάλυση σε 5,000 άτομα από το 1994, και στη Νορβηγία σε 851 τα τελευταία 3 χρόνια. Τη στιγμή της γενετικής ανάλυσης μόνο το 38% και το 53% των συγγενών που διαγνώστηκαν με FH στην Ολλανδία και στη Νορβηγία αντίστοιχα, ακολουθούσαν υπολιπιδαιμική αγωγή (Umans-Eckenhansen et al., 2003, Leren et al., 2004b). Επιπλέον, μόνο το 6% των συγγενών που διαγνώστηκαν με γενετική

ανάλυση με FH είχαν επίπεδα TC κάτω από τα επιθυμητά (5.0mmol/l) (Umans-Eckenhansen et al., 2003). Επίσης, από τους συγγενείς που διαγνώστηκαν με FH μόνο το 8% είχε ξανθώματα, τα οποία αν και αποτελούν βασικό κριτήριο της κλινικής διάγνωσης δεν εμφανίζονται συχνά. Μέσα σε ένα χρόνο από την έναρξη της γενετικής διάγνωσης στην Ολλανδία, το ποσοστό των συγγενών με FH που έπαιρναν υπολιπιδαιμική αγωγή αυξήθηκε από 38% σε 93% (Umans-Eckenhansen et al., 2003), και στη Νορβηγία από 53% σε 89% (Leren et al., 2004b). Στο ίδιο διάστημα, στους ασθενείς που ξεκίνησαν θεραπεία στην Ολλανδία, παρατηρήθηκε μείωση της TC κατά 23% (Umans-Eckenhansen et al., 2003), και στη Νορβηγία κατά 21% (Leren et al., 2004b). Χρήση στατινών την ίδια περίοδο, σύμφωνα με τη μελέτη Euroaspire II που πραγματοποιήθηκε σε 15 Ευρωπαϊκές χώρες, γινόταν από το 30.7% (στην Ελλάδα) έως το 75.1% (στην Ολλανδία) των ασθενών (EUROASPIRE II study group).

Η κλινική διάγνωση της FH σε περιπτώσεις δείκτες δεν είναι επαρκής για την έναρξη αλυσιδωτής γενετικής ανάλυσης σε μια οικογένεια, και σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO για την έναρξή της είναι απαραίτητη η εύρεση μετάλλαξης μέσω της μοριακής γενετικής ανάλυσης στην περίπτωση δείκτη (Hadfield and Humphries, 2005). Για την εφαρμογή της είναι σημαντική και η συμβολή της περίπτωσης δείκτη που δίνει τις πληροφορίες για τους συγγενείς του (Newson and Humphries, 2005).

Ο προγεννητικός έλεγχος δεν συνιστάται για την FH, εκτός και αν πρόκειται για εγκυμοσύνη ομόζυγου εμβρύου. Δεν υπάρχει κανένας λόγος διακοπής μιας κύησης, ετερόζυγου εμβρύου καθώς τα συμπτώματα της νόσου εμφανίζονται στην ενήλικη ζωή και η υπερλιπιδαιμία, όπως και η πιθανότητα εμφάνισης CAD, μπορούν να τροποποιηθούν με την εφαρμογή της κατάλληλης θεραπείας (Humphries et al., 1997).

Η εφαρμογή αλυσιδωτής γενετικής ανάλυσης στην FH φαίνεται να μην έχει ψυχολογικές συνέπειες (Tonstad, 1996, Tonstad et al., 1996, Andersen et al., 1997, van Maarle et al., 2001, van Maarle et al., 2003, Hollman et al., 2003, de Jongh et al., 2003). Λόγω της γενετικής προδιάθεσης που υπάρχει για την εκδήλωση της FH ένα μεγάλο ποσοστό των συγγενών των ατόμων με FH έχουν ήδη επίγνωση του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης CAD αλλά και της πιθανής κληρονομησης του γενετικού και βιοχημικού προφίλ, καθώς και των διαθέσιμων θεραπευτικών επιλογών. Στο πρόγραμμα που εφαρμόζεται στην Ολλανδία μόνο το 2% των συμμετεχόντων μετάνιωσαν που υποβλήθηκαν σε γενετική ανάλυση (Umans-Eckenhansen et al., 2003). Δημογραφική έρευνα στο γενικό πληθυσμό αποκάλυψε ότι το 77% θα συμμετείχε σε αλυσιδωτή γενετική ανάλυση για την FH, εάν είχαν κάποιο συγγενή με τη νόσο (Tonstad et al., 1995). Επιπλέον, το γεγονός ότι το 72-

90% των συγγενών πρώτου βαθμού στους οποίους προσφέρεται γενετική εξέταση αποφασίζουν να υποβληθούν σε αυτή, σημαίνει ότι η γενετική εξέταση είναι αποδεκτή (Umans-Eckenhansen et al., 2001, Leren et al., 2004b, Bhatnagar et al., 2000).

Στα προγράμματα γενετικής ανάλυσης στην Ολλανδία δεν συμμετέχουν παιδιά κάτω των 16 ετών, ενώ στη Νορβηγία τα συμμετέχουν μόνο όταν υπάρχουν θεραπευτικές επιλογές που εξαρτώνται από το αποτέλεσμα της ανάλυσης (Act relating to the application of biotechnology in medicine). Στη μελέτη των Umans-Eckenhansen et al., 87% των γονιών δέχτηκε τα παιδιά ηλικίας κάτω των 16 να υποβληθούν σε γενετική ανάλυση για την FH (Umans-Eckenhansen et al., 2002b). Όπως επίσης φαίνεται τα παιδιά με FH δεν διαφέρουν στη συμπεριφορά και στις ψυχολογικές εκδηλώσεις από τα υγιή (Tonstad 1996, Tonstad et al., 1996, de Jongh et al., 2003). Στη μελέτη μας συμμετείχαν οκτώ παιδιά κάτω των 16 ετών και σε δύο από αυτά βρέθηκε μετάλλαξη. Το γεγονός ότι υπάρχουν μελέτες στη χώρα μας (Traeger-Synodinos et al., 1998, Mavroidis et al., 1997) που έχει γίνει γενετική ανάλυση σε παιδιά με FH, δείχνει ότι οι γονείς αποδέχονται την εφαρμογή της.

Σε μια μελέτη στη Μεγάλη Βρετανία, τα οικονομικά οφέλη της γενετικής ανάλυσης, υπολογίστηκαν με βάση τα έτη ζωής που κερδίζει ο κάθε ασθενής, συμπεριλαμβανομένης της εξέτασης και το κόστος της θεραπείας (Marks et al., 2002). Ο εντοπισμός μελών από οικογένειες με διαγνωσμένη FH ήταν ο πιο αποτελεσματικός (κόστος για κάθε επιπλέον έτος ζωής \$5,752) και για κάθε 5 άτομα που έγινε γενετική ανάλυση βρέθηκαν 2 περιπτώσεις με FH. Το κόστος της εξέτασης ήταν \$247 και εάν η μετάλλαξη στην οικογένεια ήταν γνωστή το κόστος για κάθε επιπλέον έτος ζωής ήταν \$9,126.4. Η εξέταση του γενικού πληθυσμού ήταν η λιγότερο αποτελεσματική και χρειάστηκε η ανάλυση 1,365 ατόμων με κόστος \$18,106 για την εύρεση μιας περίπτωσης με μετάλλαξη (Marks et al., 2002).

Τα θετικά οικονομικά οφέλη από την αλυσιδωτή γενετική ανάλυση φαίνονται και από την εφαρμογή της στην Ολλανδία (Marang-van de Mheen et al., 2002). Το μεγαλύτερο μέρος του κόστους οφείλεται κυρίως στην υψηλή τιμή των στατινών, αναμένεται όμως η τιμή τους να μειωθεί καθώς τα δικαιώματα ευρεσιτεχνίας λήγουν σύντομα (Austin et al., 2004).

Σε πρόσφατη αναφορά από τους Damgaard et al., φαίνεται ότι τα επίπεδα ανίχνευσης μεταλλάξεων έχουν πέσει από το 80% στο 30% τα τελευταία 10 χρόνια, αντανakλώντας τη μελέτη ασθενών με πολύ πιο ήπιο φαινότυπο (Damgaard et al., 2005). Στη Μεγάλη Βρετανία το ποσοστό εύρεσης μετάλλαξης, σε ασθενείς που διαγνώστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια Simon Broome, ήταν 32% (Heath et al., 2001b), και στη Ολλανδία το δίκτυο λιπιδαιμικών κλινικών (Dutch Lipid Clinic

Network) βρήκε μεταλλάξεις σε ποσοστό 80% (Fouchier et al., 2001). Το γεγονός ότι το 40% των ασθενών με βέβαιη κλινική διάγνωση FH δεν είχαν μετάλλαξη στον *LDLR*, αποδίδεται στην ανεπάρκεια των μεθόδων γενετικής διάγνωσης ή στο γενετικό υπόβαθρο της FH σε κάποιες περιπτώσεις (Damgaard et al., 2005).

Ο κλινικός προσδιορισμός της FH από το Simon Broome και το Dutch Lipid Clinic Network είναι απαραίτητος για τον εντοπισμό των ατόμων που φέρουν μετάλλαξη σε ένα γονίδιο. Απόρροια αυτής της προσέγγισης είναι η εύρεση μετάλλαξης σε ποσοστό 30-40% (Damgaard et al., 2005). Σε καμία μελέτη μέχρι τώρα δεν έχει επιτευχθεί η εύρεση μετάλλαξης στο 100% των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω στοιχεία, τα οφέλη που προκύπτουν από την εφαρμογή αλυσιδωτής γενετικής ανάλυσης είναι πολλά. Ιδιαίτερα ευνοούνται οι ασθενείς που υποβάλλονται σε γενετική ανάλυση και γνωρίζουν νωρίς το αποτέλεσμα της, γιατί ξεκινούν έγκαιρα θεραπευτική αγωγή. Σημαντικά είναι και τα οικονομικά οφέλη για τη χώρα στην οποία εφαρμόζεται το πρόγραμμα γενετικής ανάλυσης. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την ομοιογένεια του Ελληνικού πληθυσμού ως προς τις μεταλλάξεις του *LDLR*, αλλά και τη γεωγραφική κατανομή κάποιων από αυτές έχουν μεγάλη σημασία. Τα χαρακτηριστικά αυτά του πληθυσμού φαίνεται να διευκολύνουν τη δυνατότητα εφαρμογής ενός προγράμματος γενετικής ανάλυσης για την FH στη χώρα μας, ιδιαίτερα μάλιστα αν αναλογιστούμε ότι ήδη εφαρμόζεται σε χώρες που παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, όπως η Ολλανδία.

4.2 Επίδραση των μεταλλάξεων του *LDLR* στο φαινότυπο

Για να συγκριθούν τα βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη το δείγμα χωρίστηκε σε 2 ομάδες. Ο διαχωρισμός έγινε με βάση την προβλεπόμενη επίδραση της μετάλλαξης στην λειτουργικότητα του LDL-R, και οι ομάδες ορίστηκαν είτε ως ελαττωματικού είτε ως αρνητικού υποδοχέα.

Τα επίπεδα TC και LDL-C ήταν υψηλότερα στην ομάδα με μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα. Επιπλέον, στην ίδια ομάδα η συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων ήταν 6 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα ελαττωματικού υποδοχέα (Dedoussis et al., 2004b). Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα άλλες όπου η συχνότητα εμφάνισης CAD και ξανθωμάτων ήταν 2 φορές μεγαλύτερη στην ομάδα αρνητικού υποδοχέα σε σχέση με την ομάδα ελαττωματικού υποδοχέα (Bertolini et al., 2000). Σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι η ύπαρξη ξανθωμάτων

επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Xenofontos et al., 2000). Η πλειοψηφία των ασθενών που συμμετείχε στην παρούσα έρευνα είχε καταγωγή από την επαρχία, όπου συνήθως κυριαρχεί η υιοθέτηση της Μεσογειακής δίαιτας, γι' αυτό η μεγάλη διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων μεταξύ των δύο ομάδων αποδίδεται στο είδος της μετάλλαξης και όχι τόσο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Dedoussis et al., 2004b). Η διαφορά που παρατηρήθηκε στα επίπεδα TC και LDL-C μεταξύ των δύο ομάδων ελαττωματικού και αρνητικού υποδοχέα είναι σύμφωνη με προηγούμενα αποτελέσματα όπου η LDL-C ήταν υψηλότερη κατά 18% σε ασθενείς με μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα σε σχέση με ασθενείς με μετάλλαξη ελαττωματικού υποδοχέα (Bertolini et al., 2000).

Η σύσταση των ξανθωμάτων είναι όμοια με της αθηρωματικής πλάκας, και σε κλινικές μελέτες η ύπαρξή τους έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση CAD σε ασθενείς με FH (Ferrieres et al., 1995, Hopkins et al., 2001, Alonso et al., 2002). Ο μηχανισμός με τον οποίο δημιουργούνται ξανθώματα σε κάποιους ασθενείς ενώ σε κάποιους άλλους όχι, δεν είναι γνωστός. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι ίσως να υπάρχει και κάποιο άλλο γονίδιο εκτός του *LDLR* που να επηρεάζει την ύπαρξη ξανθωμάτων (Vergopoulos et al., 1997). Το 2005 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα για να προσδιοριστεί εάν τα μακροφάγα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με FH με ξανθώματα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μετατραπούν σε αφρώδη μετά από υπερδιάθεση oxLDL, σε σχέση με τα μακροφάγα από ασθενείς που δεν παρουσίαζαν ξανθώματα (Artieda et al., 2005). Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε μακροφάγα ασθενών με και χωρίς ξανθώματα, αλλά και το περιεχόμενο των κυττάρων σε λιπίδια, έδειξε ότι τα μακροφάγα από τις δύο ομάδες ασθενών έχουν διαφορετική ανταπόκριση στην oxLDL, καθώς οι ασθενείς με ξανθώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποθήκευση εστέρων χοληστερόλης και έχουν διαφορετική γονιδιακή έκφραση. Οι ασθενείς με ξανθώματα έχουν αυξημένα επίπεδα τρυπτάσης, παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor α -TNF- α), IL-6 και IL-8. Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω ότι η ύπαρξη ξανθωμάτων σχετίζεται με αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα λιπιδίων, και υψηλότερη φλεγμονώδη ανταπόκριση στα μακροφάγα μετά από επίδραση με oxLDL (Artieda et al., 2005).

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για να συσχετιστεί η ύπαρξη συγκεκριμένων μεταλλάξεων με την κλινική εικόνα της FH, σε πολλές περιπτώσεις όμως τα επίπεδα λιπιδίων διαφέρουν κατά πολύ όχι μόνο ανάμεσα σε ασθενείς που φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις στον *LDLR* αλλά και ανάμεσα σε ασθενείς που φέρουν την ίδια μετάλλαξη (Moorjani et al., 2003).

Για παράδειγμα η πιο συχνή μετάλλαξη στην Ολλανδία (N543H), οδηγεί σε φαινότυπο με επίπεδα LDL-C που κυμαίνονται από φυσιολογικά έως και πάνω από

το 95^ο εκατοστημόριο για το γενικό πληθυσμό (Umans-Eckenhause et al., 2002a).

Το φαινόμενο αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι περιβαλλοντικοί και άλλοι γενετικοί παράγοντες καθορίζουν το φαινότυπο. Επιπλέον, η σύγκριση του φαινότυπου σε μεγάλο αριθμό ασθενών με βάση το γενετικό υπόβαθρο του LDL-R είναι δύσκολη. Αυτό συμβαίνει γιατί η μεγάλη ετερογένεια των μεταλλάξεων στον *LDLR*, που είναι εμφανής στους περισσότερους πληθυσμούς, καθιστά δύσκολη τη συλλογή επαρκούς αριθμού ασθενών με διαφορετικές μεταλλάξεις και την ταξινόμησή τους σε ομάδες.

Οι Graham et al., μελέτησαν τη συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου σε ετεροζυγώτες με FH που έφεραν διαφορετικές μεταλλάξεις στον *LDLR*. Τα άτομα με μεταλλάξεις ανάγνωσης πλαισίου είχαν υψηλότερα επίπεδα LDL-C σε σχέση με εκείνους που είχαν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (Graham et al., 1999). Κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και σε Γάλλο-Καναδούς με FH (Moorjani et al., 1993). Στους φορείς μιας μεγάλης έλλειψης (>5Kb) μεταξύ του υποκινητή και του πρώτου εξόνιου του *LDLR* (μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα), η μέση τιμή TC ήταν πολύ υψηλότερη σε σχέση με άτομα που είχαν την μετάλλαξη W66G (μετάλλαξη ελαττωματικού υποδοχέα) (Moorjani et al., 1993). Ανάλογα, Αφρικανοί με τη μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα V408M είχαν υψηλότερα επίπεδα TC σε σχέση με Αφρικανούς με τη μετάλλαξη ελαττωματικού υποδοχέα D206E (Kotze et al., 1993).

Η πιο πρόσφατη μελέτη συσχέτισης γονότυπου *LDLR* και κλινικής εικόνας έδειξε ότι συγκεκριμένες μεταλλάξεις επηρεάζουν ακόμη και το μέγεθος και την πυκνότητα της LDL. Οι ασθενείς με μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα (French Canadian έλλειψη >15kb, R329X, Y468X, C646Y) είχαν μικρά και πυκνά σωματίδια LDL σε σχέση με μάρτυρες, και σε αυτό μπορεί να οφείλεται ο αυξημένος κίνδυνος CAD στους πρώτους (Hogue et al., 2005).

Τέλος το είδος της μετάλλαξης φαίνεται να επηρεάζει και την ηλικία κατά την οποία εκδηλώνεται η CAD. Σε ασθενείς με μετάλλαξη αρνητικού υποδοχέα τα περιστατικά CAD εκδηλώνονται σε νεαρότερη ηλικία σε σχέση με τους ασθενείς με μετάλλαξη ελαττωματικού υποδοχέα (Volh et al., 1997, Gaudet et al., 1999).

Η μικρή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της χοληστερόλης και της λειτουργικότητας του LDL-R σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων που έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες υποδηλώνει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν το φαινότυπο της FH (Sun et al., 1998).

Η σημαντική επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στο φαινότυπο της FH επιβεβαιώνεται από την μελέτη των Pimstone et al., που σύγκριναν τα επίπεδα λιπιδίων και τη συχνότητα εμφάνισης CAD σε Κινέζους ασθενείς, με χαρακτηρισμένη μετάλλαξη στον *LDLR*, που ζούσαν είτε στην Κίνα είτε στον Καναδά. Υψηλότερα

επίπεδα LDL-C, καθώς και συχνότερη εμφάνιση CAD και ξανθωμάτων παρατηρήθηκαν στους ασθενείς που ζούσαν στον Καναδά σε σχέση με εκείνους που ζούσαν στην Κίνα. Οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν στην αυξημένη πρόσληψη λίπους και τα μειωμένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας των πρώτων (Pimstone et al., 1998).

Σε μελέτες που συμπεριέλαβαν άτομα οικογενειών που προέρχονταν από περισσότερες από μια γενιές παρατηρήθηκε ότι η εκδήλωση CAD και η θνησιμότητα από αυτή, παρουσιάζονται σε μεγαλύτερη ηλικία στους ετεροζυγώτες που έζησαν στις αρχές του 20ου αιώνα σε σχέση με εκείνους που έζησαν στο τέλος του (Willialms et al., 1986, Sijbrands et al., 2001). Και οι δύο μελέτες αποδίδουν τη διαφορά αυτή στις αλλαγές του τρόπου ζωής, ειδικότερα στην αύξηση πρόσληψης διαιτητικού λίπους και την καθιστική ζωή. Σε προοπτική μελέτη 15 χρόνων, που έγινε σε 639 ασθενείς με FH που παρακολουθούνταν στη Μονάδα Λιπιδίων του Ιπποκρατείου, φάνηκε ότι το κάπνισμα αυξάνει την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου (Panagiotakos et al., 2003).

Όταν συγκρίναμε ασθενείς με μετάλλαξη στον *LDLR* με ασθενείς χωρίς μετάλλαξη, παρατηρήσαμε χαμηλότερα επίπεδα Apo-AI και 2 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης CAD, στην πρώτη ομάδα. Η συγκέντρωση της Apo-AI στο πλάσμα επηρεάζεται από την ταχύτητα με την οποία παράγεται αλλά και το χρόνο παραμονής της στο πλάσμα, ενώ η συγκέντρωσή της στα σωματίδια των ώριμων HDL-C αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των HDL σωματιδίων (Maciejko et al., 1983). Όπως και η HDL-C η Apo-AI συνδέεται αρνητικά με τον κίνδυνο εμφάνισης CAD (Maciejko et al., 1983, Barbir et al., 1988, Bovet et al., 1989).

Τα αποτελέσματα μας είναι αντίστοιχα με παλαιότερων αναφορών. Οι ασθενείς με μετάλλαξη στον *LDLR* σε σχέση με ασθενείς χωρίς μετάλλαξη έχουν αυξημένα επίπεδα TC, LDL-C και Apo-B και χαμηλότερα επίπεδα HDL-C (Van Gaal et al., 2001). Ανάλογα ευρήματα παρουσιάζονται και από τους Yu et al. όπου οι ασθενείς με μετάλλαξη στον *LDLR* εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα TC και LDL-C καθώς και υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης CAD, σε σχέση με τους ασθενείς στους οποίους δεν έχει βρεθεί μετάλλαξη (Yu et al., 2002). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η επιβεβαίωση της FH με γενετική διάγνωση συσχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα CAD και θετικό τεστ κοπώσεως (Descamps et al., 2003). Συνακόλουθα, παρά τον όμοιο φαινότυπο, οι ασθενείς που φέρουν μετάλλαξη στον *LDLR* είναι πιθανό να έχουν υψηλότερο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε σχέση με εκείνους χωρίς μετάλλαξη (Descamps et al., 2003). Κάτι τέτοιο, υποδεικνύει ότι εκτός από τις μεταλλάξεις στον *LDLR*, είναι πιθανό μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια να προκαλούν FH με ηπιότερο φαινότυπο.

Πέρα από την επίδραση που έχουν οι μεταλλάξεις στο φαινότυπο της FH φαίνεται σε κάποιες περιπτώσεις να επηρεάζουν και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί δώδεκα μελέτες για τη συσχέτιση των μεταλλάξεων στο γονίδιο του *LDLR* με την ανταπόκριση στη θεραπεία με στατίνες, καθώς ένα από τα ερωτήματα που προκύπτουν είναι εάν ο μηχανισμός δράσης των στατινών επηρεάζεται όχι μόνο από την ύπαρξη μεταλλάξεων στον *LDLR* αλλά και από το είδος της μετάλλαξης (Choumerianou and Dedoussis, 2005).

Επτά από αυτές έδειξαν ότι η δράση των στατινών στη μείωση της LDL-C επηρεάζεται από το γονότυπο του *LDLR* (Heath et al., 2004, Leitersdorf et al., 1993, Vohl et al., 2002, Couture et al., 1998, Chaves et al., 2001, Jeenah et al. 1993, Kajinami et al. 1998). Οι υπόλοιπες 5 δεν έδειξαν καμία συσχέτιση μεταξύ της ανταπόκρισης στη θεραπεία και του γονότυπου (Broholt-Petersen et al., 2001, Sijbrands et al., 1998, Sun et al., 1998, Vuorio et al., 1995, Leren et al., 1995) (**Πίνακας 4.1**). Η παρουσία πάνω από 900 μεταλλάξεων στον *LDLR* καθιστά δύσκολη την πραγματοποίηση μελετών με πολλούς συμμετέχοντες οι οποίοι θα ομαδοποιούνται με βάση τον γονότυπο του *LDLR*, επομένως ο ακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης γονότυπου-στατίνης παραμένει άγνωστος. Στην παρούσα μελέτη αν και υπήρχαν διαθέσιμα τα επίπεδα λιπιδίων, μετά από κάθε επίσκεψη των ασθενών στη Μονάδα Λιπιδίων, δεν έγινε συσχέτιση του είδους της μετάλλαξης με την ανταπόκριση στη θεραπεία γιατί η μελέτη δεν σχεδιάστηκε για το σκοπό αυτό και οι ασθενείς ακολούθησαν διαφορετικές φαρμακευτικές αγωγές.

Χαρακτηριστική ήταν επίσης και η επίδραση που παρατηρήσαμε να έχει η πρωτοαναφερόμενη μετάλλαξη -45delT (FH Pyrgos), στα επίπεδα λιπιδίων (Dedoussis et al., 2003). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 9 μεταλλάξεις στον υποκινητή του *LDLR* μεταξύ των οποίων και η -45delT. Μετά από ανάλυση σε όλα τα εξόνια του *LDLR* διαπιστώθηκε ότι αυτή ήταν η μόνη μετάλλαξη που υπήρχε στη συγκεκριμένη οικογένεια από τον Πύργο.

Το ερώτημα που μας απασχόλησε αρχικά ήταν αν η FH στη συγκεκριμένη οικογένεια οφειλόταν στη μετάλλαξη -45delT. Για να επιβεβαιωθεί ότι η ίδια μετάλλαξη δεν ήταν παρούσα σε φυσιολογικά άτομα, όπως προτείνεται για την επιβεβαίωση της παθογένειας νέων μεταλλάξεων (Cotton και Scriver, 1998), έγινε γενετική ανάλυση σε 200 φυσιολογικούς μάρτυρες από τους οποίους κανείς δεν ήταν φορέας της. Ακολούθησαν πειράματα έκφρασης και λειτουργικότητας του LDL-R, σε δείγματα από την οικογένεια σε σύγκριση με φυσιολογικούς μάρτυρες. Πειράματα επιμόλυνσης με πλασμίδιο που περιείχε τη μεταλλαγμένη αλληλουχία του υποκινητή και γονίδιο αναφοράς (λουσιφεράση) έδειξαν ότι η μετάλλαξη μειώνει τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα

ποσοτικοποίησης του mRNA για τον LDL-R στην ασθενή σε σύγκριση με φυσιολογικό μάρτυρα.

Η μετάλλαξη -45delT βρίσκεται στην επαναλαμβανόμενη περιοχή 3 του υποκινητή του *LDLR*, όπου έχουν βρεθεί 5 μεταλλάξεις (Koivisto et al., 1994, Sun et al., 1995, Mozas et al., 2002). Η επαναλαμβανόμενη περιοχή 3 του υποκινητή του *LDLR* είναι το σημείο πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και καθώς είναι ο μόνος μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται στην περιοχή, υποθέτουμε ότι η ύπαρξη της μετάλλαξης επηρεάζει την πρόσδεση του (Südhoff et al., 1987, Chang et al., 1996).

Από τις 4 μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί στην επαναλαμβανόμενη περιοχή 3 του υποκινητή του *LDLR* έχουν γίνει πειράματα μελέτης της πρόσδεσης του Sp1 για τις δύο, στις θέσεις -45 και -43. Η μετάλλαξη στη θέση -43 καταργεί την ικανότητα πρόσδεσης του υποκινητή στον Sp1 μειώνοντας τη δραστηριότητα του στο 5% σε σχέση με τον φυσιολογικό υποκινητή (Koivisto et al., 1994) ενώ η ικανότητα πρόσδεσης του υποκινητή με την μετάλλαξη -45 T>C στον Sp1 είναι 20% του φυσιολογικού (Sun et al., 1995). Οι ετεροζυγώτες ασθενείς που έφεραν τη μετάλλαξη -43 είχαν υψηλότερα επίπεδα TC σε σχέση με τον φορέα της μετάλλαξης -45 T>C. Η διαφορά στα επίπεδα της TC μπορεί να εξηγηθεί από τη μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του Sp1 στον υποκινητή, όταν υπάρχει η μετάλλαξη στη θέση -43, κάτι που οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφή του *LDLR*.

Σε συνδυασμό με την επαναλαμβανόμενη περιοχή 2, η επαναλαμβανόμενη περιοχή 3 ελέγχει την έκφραση του *LDLR* ρυθμιζόμενη από τις στερόλες (Sanchez et al., 1995). Πειράματα με γονίδια αναφοράς έδειξαν ότι ο υποκινητής με τη μετάλλαξη -49 C>T και υποκινητής φυσικού τύπου είχαν την ίδια μεταγραφική δραστηριότητα σε καλλιέργειες απουσία ορού. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έχει την ικανότητα “ανταπόκρισης” στα χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης. Αυτά τα δεδομένα μπορούν να ερμηνεύσουν την καλή ανταπόκριση των μελών της οικογένειας με τη μετάλλαξη -49 T>C στη διαιτητική και φαρμακευτική αγωγή (Mozas et al., 2001). Στη δική μας μελέτη, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με υποκινητή με τη μετάλλαξη -45delT παρουσίασαν απώλεια στη ρύθμιση από στερόλες σε σχέση με τα πλασμίδια με υποκινητή φυσικού τύπου ή με πλασμίδια με υποκινητή αλληλουχίας -45 T>C (Dedoussis et al., 2003).

Σημαντική μείωση της ικανότητας πρόσδεσης του LDL-R κατά 76% παρατηρήσαμε στην ασθενή με την μετάλλαξη -45delT σε μονοπύρηνια μετά από επώαση με Dil-LDL. Παρά το ότι η αδερφή της ασθενούς είχε φυσιολογικό φαινότυπο και δεν ήταν φορέας της συγκεκριμένης μετάλλαξης, η μείωση της ικανότητας πρόσδεσης του LDL-R σε αντίστοιχο πείραμα ήταν 44% (Dedoussis et al., 2003).

Στην περίπτωση της άλλοι γενετικοί παράγοντες ή συνδυασμός τους (απλότυπος) μπορεί να επηρεάζουν την λειτουργικότητα του LDL-R.

Ομάδα	Αριθμός Ασθενών	Στατίνη (Δόση mg)	Εθνικότητα	Αποτελέσματα
Leitersdorf et al., 1993	64	Φλουβαστατίνη (40)	Κauκάσιοι	Οι φορείς της μετάλλαξης Lebanese (αρνητικού) είχαν καλύτερη ανταπόκριση σε σύγκριση με τους φορείς των Sephardic και Lithuanian (ελαττωματικού).
Broholt-Petersen et al., 2001	58	Φλουβαστατίνη (40)	Κauκάσιοι	Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ φορέων μεταλλάξεων ελαττωματικού σε σύγκριση με αρνητικού υποδοχέα.
Sijbrands et al., 1998	27	Σιμβαστατίνη (20)	Κauκάσιοι	Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ φορέων μεταλλάξεων ελαττωματικού σε σύγκριση με αρνητικού υποδοχέα.
Vohl et al., 2002	63	Σιμβαστατίνη (20)	Κauκάσιοι	Οι φορείς μεταλλάξεων αρνητικού είχαν καλύτερη ανταπόκριση σε σχέση με τους ελαττωματικού υποδοχέα .
Couture et al., 1998	63	Σιμβαστατίνη (20)	Κauκάσιοι	Οι φορείς μεταλλάξεων αρνητικού είχαν καλύτερη ανταπόκριση σε σχέση με τους ελαττωματικού υποδοχέα .
Chaves et al., 2001	42	Σιμβαστατίνη (20)	Κauκάσιοι	Οι φορείς μεταλλάξεων ελαττωματικού είχαν καλύτερη ανταπόκριση σε σχέση με τους αρνητικού υποδοχέα .
Jeenah et al., 1993	20	Σιμβαστατίνη (40)	Αφρικανοί	Φορείς της Africaner-2 (αρνητικού) είχαν καλύτερη ανταπόκριση σε σχέση με της Africaner-1 (ελαττωματικού).
Sun et al., 1998	42	Σιμβαστατίνη (40)	Κauκάσιοι	Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ φορέων μεταλλάξεων ελαττωματικού σε σύγκριση με αρνητικού υποδοχέα.
Heath et al., 1999	109	Σιμβαστατίνη (10, 20 και 40)	Κauκάσιοι	Οι φορείς ελαφριάς μετάλλαξης ανταποκρίθηκαν καλύτερα στα 40 mg από τους φορείς βαριάς. Στις άλλες δόσεις δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.
Vuorio et al., 1995	149	Λοβαστατίνη (40 και 80)	Κauκάσιοι	Οι φορείς FH Helsinki και FH North Karelia είχαν όμοια ανταπόκριση.
Leren et al., 1995	58	Λοβαστατίνη (80)	Κauκάσιοι	Φορείς χαρακτηρισμένων μεταλλάξεων είχαν όμοια ανταπόκριση με τους μη χαρακτηρισμένους.
Kajinami et al., 1998	12	Πραβαστατίνη (20) Χολεσθηραμίνη	Ασιάτες	Οι φορείς της FH Kanazawa-2 carriers (ελαττωματικού) είχαν καλύτερη ανταπόκριση από τους φορείς FH Tonami-1 (αρνητικού).

Πίνακας 4.1. Μελέτες που έγιναν για την αξιολόγηση της επίδρασης του γονότυπου στον *LDLR* στην ανταπόκριση στη θεραπεία με στατίνη (Choumerianou and Dedoussis, 2005).

Ακόμη και διατροφικοί παράγοντες επηρεάζουν τη συγκέντρωση της LDL-C πχ. η πρόσληψη αλκοόλ καθυστερεί τον μεταβολισμό της οδηγώντας σε μειωμένη

σύνθεση LDL (Taskinen et al., 1987). Οι διαφορετικές διατροφικές συνήθειες πριν τη διάγνωση, του πατέρα, κάτοικου της επαρχίας και των παιδιών κατοίκων Αθήνας, μπορούν να δικαιολογήσουν τον ήπιο φαινότυπο του πρώτου (Dedoussis et al., 2003, Hill et al., 1991). Παρ' όλα αυτά τα *in vitro* λειτουργικά πειράματα υποστηρίζουν ότι η μετάλλαξη -45delT στον υποκινητή του *LDLR* είναι το αίτιο της νόσου στην οικογένεια που μελετήθηκε (Dedoussis et al., 2003).

4.3 Άλλοι γενετικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον φαινότυπο της FH

Όπως προαναφέρθηκε, σε πολλές περιπτώσεις τα επίπεδα λιπιδίων διαφέρουν κατά πολύ όχι μόνο μεταξύ ασθενών που φέρουν μετάλλαξη διαφορετικού τύπου στον *LDLR* αλλά ακόμη και μεταξύ ασθενών που φέρουν την ίδια μετάλλαξη (Moorjani et al., 2003). Σε αυτές τις περιπτώσεις ενισχύεται η υπόθεση ότι και άλλοι γενετικοί παράγοντες συμμετέχουν στον προσδιορισμό του φαινότυπου της FH. Η υπόθεση αυτή μας οδήγησε στην ανάλυση κάποιων περαιτέρω γονιδίων στους ασθενείς με FH. Τα γονίδια που επιλέχθηκαν κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της CAD, διαμέσου της συνάθροισης, της έκκρισης, τον καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, της ενδοθηλιακής λειτουργίας και της θρόμβωσης.

Αρχικά προσδιορίσαμε το γονότυπο της *ApoE* και μελετήσαμε την επίδραση του στην κλινική εκδήλωση της FH. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων της *ApoE* ποικίλουν από χώρα σε χώρα (Howard et al., 1998, Hallman et al., 1991, Ellsworth et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, η συχνότητα του αλληλομόρφου E4 κυμαίνεται από 0.20 στη Σουηδία έως 0.07 στην Ιταλία και 0.05 στην Ελλάδα (Tiret et al., 1994a, Kauma et al., 1998, Paschos et al., 2005). Από την παρούσα μελέτη και για το συγκεκριμένο πληθυσμό οι συχνότητες που προκύπτουν για τα τρία αλληλόμορφα E2, E3, E4 είναι 0.06, 0.86 και 0.09, αντίστοιχα (Pitsavos et al., 2005).

Στον πληθυσμό που μελετήθηκε, δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση του αλληλομόρφου E4 με τα επίπεδα λιπιδίων αλλά ούτε και με την εμφάνιση CAD. Η μικρή ή καμία συσχέτιση του γονότυπου *ApoE* με τα επίπεδα λιπιδίων ή την εμφάνιση της CAD που παρατηρείται στους ασθενείς με FH μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη και στο είδος των μεταλλάξεων του *LDLR*. Είναι πιθανό στους ασθενείς με μετάλλαξη στον *LDLR*, η επίδραση του γονότυπου της *ApoE* να υποβαθμίζεται (Pitsavos et al., 2005).

Το αλληλόμορφο E4 έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα TC και LDL-C, όχι μόνο στο γενικό πληθυσμό (Howard et al., 1998, Hallman et al., 1991, Davignon et al., 1988, Wilson et al., 1994, Wilson et al., 1996) αλλά και στους ασθενείς με FH (Bertolini et al., 2004, Wiegman et al., 2003). Στο γενικό πληθυσμό, 8-11% της

διακύμανσης στη συγκέντρωση της LDL-C αποδίδεται στο γονότυπο της *ApoE* (Humphries et al., 2001). Υπάρχουν όμως μελέτες σε ασθενείς με FH που δεν δείχνουν καμία συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου της *ApoE* και των επιπέδων των λιπιδίων (Mozas et al., 2003, Vuorio et al., 1997, Carmena- Ramon et al., 2000). Επιπλέον, κάποιες έρευνες συσχετίζουν τα αλληλόμορφα E4 και E2 με την CAD (Vuorio et al., 1997, Hixson, 1991), ενώ άλλες δεν δείχνουν καμία συσχέτιση (Ferrieres et al., 1995, Bertolini et al., 2000).

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της Apo-E είναι υψηλότερα σε άτομα που φέρουν το E2 αλληλόμορφο, ενδιάμεσα σε αυτούς με το E3, και χαμηλότερα σε εκείνους με το E4 (Bowerwinkle et al., 1988, Stuyt et al., 1991, Reily et al., 1991). Το αλληλόμορφο E4 σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή και μειωμένο καταβολισμό των λιποπρωτεϊνών σε σχέση με το E3 (Davignon et al., 1988). Αντίθετα, η ύπαρξη του αλληλομόρφου E2 σχετίζεται με μειωμένη παραγωγή LDL, και αυξημένο καταβολισμό, με αποτέλεσμα τη μείωση της LDL-C. Παρ' όλα αυτά το αλληλόμορφο E2 σχετίζεται με υπερτριγλυκεριναιμία (Wilson et al., 1994), κάτι που μπορεί να εξηγήσει τη συσχέτιση του σε κάποιες μελέτες με τον αυξημένο κίνδυνο CAD.

Παρά το γεγονός ότι η Apo-E εμπλέκεται σε πολλά στάδια του μεταβολισμού των λιπιδίων όπως τη συγκέντρωση χοληστερόλης στα μακροφάγα ή την αντίστροφη μεταφορά της, ο μηχανισμός με τον οποίο η E4 ισομορφή σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο CAD δεν έχει διευκρινιστεί. Στη μελέτη των Wilson et al. φαίνεται ότι ο αυξημένος κίνδυνος για την εμφάνιση CAD, όταν υπάρχει το E4, παραμένει ακόμη και μετά από διόρθωση για κλασσικούς παράγοντες κινδύνου όπως φύλο και ηλικία, που σημαίνει ότι ο γονότυπος μπορεί να σχετίζεται με τον τύπο των λιποπρωτεϊνών (ποιότητα) και όχι με τη συγκέντρωσή τους (ποσότητα) (Wilson et al., 1996).

Από τις πρώτες προσεγγίσεις στην έρευνα των λιποπρωτεϊνών, τόσο στο γενικό πληθυσμό όσο και σε ομάδες ασθενών όπως οι FH, είναι ο εντοπισμός γενετικών παραλλαγών στα γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμισή τους, και ο καθορισμός τους ως γενετικών δεικτών στον προσδιορισμό των λιπιδίων.

Η Apo-B, παίζει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Διάφοροι παράγοντες, μεταβολικοί, διαιτητικοί και ορμονικοί επηρεάζουν τη βιοσύνθεσή της. Η έκφραση του γονιδίου *ApoB* είναι χαρακτηριστικό ορισμένων ιστών όπως του ηπατικού και του λεπτού εντέρου. Επιπλέον, τα επίπεδα του mRNA της Apo-B σε μια κυτταρική καλλιέργεια διατηρούνται σταθερά σε διαφορετικές μεταβολικές καταστάσεις, κάτι που δείχνει ότι η μεταγραφή του γονιδίου είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη (Jeerooburkhan et al., 2001). Η μεταμεταγραφική τροποποίηση του mRNA, οδηγεί στη μετάφραση δύο μορίων, ενός άθικτου και ενός απαλειμμένου, τα

οποία αποδίδουν την Apo-B-100 και την Apo-B-48 αντίστοιχα (Jeerooburkhan et al., 2001). Η ποσότητα της Apo-B που παράγεται υπερβαίνει κατά πολύ την ποσότητα που εκκρίνεται και η έκφραση της Apo-B ρυθμίζεται μεταμεταφραστικά στα στάδια της μετατόπισης της από τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου στον αυλό και στην αποικοδόμησή της. Οι λιποπρωτεΐνες Apo-B-100 έχουν μεγαλύτερη τάση να γίνονται αθηρωματικές σε σχέση με τις Apo-B-48 και θεωρούνται παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη πρόωρης αθηροσκλήρυνσης (Greeve et al., 1993). Οι ασθενείς με FH φαίνεται να έχουν αυξημένη σύνθεση λιποπρωτεϊνών που περιέχουν Apo-B (Guo et al., 2005).

Η Apo-B-100 αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο για την CAD και τα αυξημένα επίπεδα της είναι χαρακτηριστικό μερικών μορφών υπερλιπιδαιμίας. Πέρα από το γονίδιο *ApoB* και τις μεταλλάξεις που υπάρχουν σε αυτό, φαίνεται πως και άλλα γονίδια επηρεάζουν τα επίπεδα της συγκεκριμένης απολιποπρωτεΐνης στο πλάσμα ασθενών με FH.

Για την ανάλυση των πολυμορφισμών PON-2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, FGB G-455A και NOS A-922G και την εκτίμηση της επίδρασής τους στα επίπεδα λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα της Apo-B επιλέχθηκαν τυχαία 84 ετεροζυγώτες ασθενείς με FH. Λόγω του μικρού αριθμού των ατόμων που αναλύθηκαν δεν ήταν δυνατή η δημιουργία απλοτύπων, γι' αυτό η επίδραση κάθε πολυμορφισμού μελετήθηκε ως ανεξάρτητος από τους άλλους παράγοντας.

Το γονίδιο PON-2 είναι ένα σημαντικό γονίδιο προς μελέτη, για τη συμβολή του στη δημιουργία της αθηροσκλήρυνσης. Εκφράζεται σε όλα τα ενδοθηλιακά και αγγειακά κυτταρικά τοιχώματα όπου ασκεί αντιοξειδωτική δράση μέσω της υδρόλυσης των υπεροξειδίων που σχηματίζονται στην LDL (Ng et al., 2001). Αναλύοντας το γονίδιο αυτό για τον πολυμορφισμό Ser311Cys, σε ασθενείς με FH, βρήκαμε ότι επηρεάζει τα επίπεδα TC, LDL-C και Apo-B (Choumerianou et al., 2006). Τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Leus et al., 2001) όπου το αλληλόμορφο Cys έχει συσχετιστεί με υψηλότερα επίπεδα TC, LDL-C και Apo-B. Στους ασθενείς που αναλύσαμε δεν βρήκαμε καμία συσχέτιση με την CAD, ένα εύρημα που δεν διαφέρει από των Leus et al. (Leus et al., 2001) οι οποίοι συσχέτισαν το αλληλόμορφο Cys με προστατευτικές ιδιότητες κατά της CAD. Οι Saha et al. (Saha et al., 1991) αναφέρουν ότι τα άτομα με υψηλή δραστηριότητα PON έχουν αυξημένα επίπεδα TG και HDL-C, ίσως λόγω της δράσης της PON, καθώς το PO αδρανοποιεί την LPL.

Η σχέση μεταξύ της PON και της LPL μπορεί να είναι η υδρόλυση κάποιου υποστρώματος από την PON στο πλάσμα που να επηρεάζει την δράση της LPL άρα και το μεταβολισμό των λιπιδίων. Εναλλακτικά, η LPL μπορεί να είναι καθοριστικός

παράγοντας των επιπέδων της HDL, και επειδή η PON αποτελεί ένζυμο που υπάρχει στην HDL, η συγκέντρωση της PON στο πλάσμα να προσδιορίζεται έμμεσα από την LPL (Nevin et al., 1996).

Ο πολυμορφισμός LPL Asn291Ser φαίνεται να αποσταθεροποιεί τη δημιουργία του ομοδιμερούς σύμπλοκου με αποτέλεσμα τη μείωση της λιπολυτικής δραστηριότητας του ενζύμου (Fisher et al., 1997). Το αλληλόμορφο Ser στη θέση 291 της LPL βρήκαμε μόνο σε τρεις ασθενείς οι οποίοι μάλιστα ήταν ετεροζυγώτες (Asn/Ser) (Choumerianou et al., 2006). Η συχνότητα του αλληλομόρφου Ser (0.02) που παρατηρήσαμε ήταν πολύ χαμηλότερη σε σχέση με αυτή που έχει προηγουμένως αναφερθεί (0.065) σε ασθενείς με FH (Wittekoek et al., 1998). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική καταγωγή, των ατόμων.

Στην προσπάθεια συσχέτισης του πολυμορφισμού με τα επίπεδα λιπιδίων, βρήκαμε ότι οι φορείς του πολυμορφισμού είχαν χαμηλότερα επίπεδα Apo-B σε σχέση με τους ομοζυγώτες για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (Choumerianou et al., 2006). Οι Wittekoek et al. μελέτησαν τον ίδιο πολυμορφισμό σε 1045 ασθενείς με FH. Αρχικά, χώρισαν το δείγμα σε δύο ομάδες με βάση την ύπαρξη του πολυμορφισμού και στη συνέχεια σε τεταρτημόρια για τα επίπεδα HDL-C και TG. Οι ετεροζυγώτες ήταν περισσότεροι στο τεταρτημόριο με τα χαμηλότερα επίπεδα HDL-C. Η εμφάνιση της CAD ήταν σχεδόν δύο φορές συχνότερη στους ετεροζυγώτες σε σχέση με εκείνους χωρίς τον πολυμορφισμό (Wittekoek et al., 1998). Στη μελέτη μας δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και των επιπέδων HDL-C και TG (Choumerianou et al., 2006). Σε μια άλλη μελέτη, οι ετεροζυγώτες είχαν αυξημένα επίπεδα TG και μειωμένη HDL-C (Wittrup et al., 1999). Σε ανάλυση 72 ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και των επιπέδων Apo-B (Nevin et al., 1996). Σύγκριση μεταξύ υγιών ματρώρων και ασθενών με πρόωρη CAD έδειξε ότι η ύπαρξη του πολυμορφισμού στους υγιείς οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα HDL-C, ενώ η επίδραση στην ομάδα των ασθενών δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Blatter et al., 1993).

Ένας ακόμη πολυμορφισμός που βρέθηκε να επηρεάζει τα επίπεδα της Apo-B είναι ο PAI T11053G. Βρήκαμε ότι το αλληλόμορφο T σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα Apo-B (Choumerianou et al., 2006). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δημοσιευμένες μελέτες που να συσχετίζουν την ύπαρξη του πολυμορφισμού με τα επίπεδα λιπιδίων σε υγιή πληθυσμό αλλά ούτε και σε ασθενείς με FH. Ο πολυμορφισμός -675 4G/5G στον υποκινητή του γονιδίου PAI-1 έχει μελετηθεί περισσότερο και το αλληλόμορφο 4G έχει συσχετιστεί με υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα και υψηλά επίπεδα PAI-1 στο πλάσμα σε σχέση με το 5G. Ο ίδιος πολυμορφισμός, και πιο συγκεκριμένα η ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο 4G,

σχετίζεται επίσης με αυξημένα επίπεδα TG (Wittrup et al., 1999). Όσο για τη συγκέντρωση του PAI-1 στο πλάσμα, αποτελεί δείκτη καρδιακών επεισοδίων σε ασθενείς με σταθερή στηθάγχη (van Bockxmeer et al., 2001). Παρά το ότι ο PAI-1 συντίθεται στους αγγειακούς ιστούς, στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό, ο μηχανισμός με τον οποίο τα επίπεδα του αυξάνονται όταν υπάρχει CAD, δεν είναι γνωστός. Η συγκέντρωση του PAI-1 στο πλάσμα ρυθμίζεται από γενετικούς παράγοντες. Η σύνθεση, επομένως και η συγκέντρωση, του PAI-1 καθορίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής του γονιδίου, και οι διαφορές τους οφείλονται σε διαφορετικές μορφές του γονιδίου (Henry et al., 1998).

Τα επίπεδα ινωδογόνου στο πλάσμα σχετίζονται με κλασσικούς παράγοντες κινδύνου μεταξύ των οποίων η ηλικία, η φυσική δραστηριότητα, η υπέρταση και το κάπνισμα (Panahloo et al., 1995). Επιπλέον, το ινωδογόνο συγκαταλέγεται στις πρωτεΐνες της οξείας φάσης του οποίου η ρύθμιση γίνεται μέσω της ενεργοποίησης των αποκρινόντων στοιχείων IL-6 που βρίσκονται στον υποκινητή και των τριών αλυσίδων ινωδογόνου. Σε καταστάσεις όπως η μόλυνση από ιό, η φλεγμονή, τα τραύματα και η καταστροφή των ιστών η συγκέντρωση του στο πλάσμα αυξάνεται έως και 5 φορές. Η αθηροσκλήρυνση παρουσιάζει ομοιότητες με τη φλεγμονώδη απάντηση. Επομένως η ίδια η αθηροσκλήρυνση από πολύ νωρίς μπορεί να οδηγήσει στη φλεγμονώδη απάντηση η οποία θα προκαλέσει αύξηση των πρωτεϊνών της οξείας φάσης και του ινωδογόνου. (Juhan-Vague et al., 1996).

Η ανάλυση που κάναμε για τον πολυμορφισμό G-455A στο γονίδιο FGB και η εκτίμηση της επίδρασής του στα επίπεδα λιπιδίων ασθενών με FH, αποκαλύπτουν ότι τα άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο G είχαν υψηλότερα επίπεδα Apo-B (Choumerianou et al., 2006). Ο πολυμορφισμός σε προηγούμενες μελέτες έχει συσχετιστεί μόνο με τα επίπεδα ινωδογόνου και όχι με τα επίπεδα λιπιδίων. Όμως τα υψηλά επίπεδα ινωδογόνου αυξάνουν την προγνωστική ισχύ των υψηλών επιπέδων LDL-C. Η ομάδα των Lam et al., (Lam et al., 1999) βρήκε θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ινωδογόνου και των επιπέδων TC και LDL-C και αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα HDL-C, μετά από ανάλυση σε 2900 τυχαία επιλεγμένα άτομα. Στις γυναίκες, το ινωδογόνο σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα TG (Henry et al. 1984).

Από τους πολυμορφισμούς στο FGB οι G-455A και G-854A είναι αυτοί που έχουν μεγαλύτερη επίδραση στη λειτουργικότητα του γονιδίου (Sakkinen et al., 2000, Lam et al. 1999). Τα αντίστοιχα αλληλόμορφα έχουν ικανότητα να προσδένονται σε πυρηνικές πρωτεΐνες και έτσι να αυξάνεται η έκφραση του. Μελέτες που έγιναν για την έκφραση του FGB, με χρήση γονιδίων αναφοράς σε κύτταρα HepG2 έδειξαν ότι τα λιγότερο συχνά αλληλόμορφα -455A και -854A σχετίζονται με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα (Sakkinen et al., 2000, Lam et al. 1999). Ο γονότυπος -

455AA εμφανίζεται σε ποσοστό 10-20% στον πληθυσμό και τα άτομα αυτά έχουν αυξημένα επίπεδα ινωδογόνου τουλάχιστον κατά 10% σε σχέση με εκείνους που έχουν γονότυπο GG. Είναι πιθανό οι ασθενείς με CAD που φέρουν το αλληλόμορφο A να έχουν γρήγορη εξέλιξη της νόσου, γιατί κατά τη διέγερση της οξείας φάσης τα επίπεδα ινωδογόνου αυξάνονται περισσότερο (Choumerianou et al., 2006).

Ένας ακόμη πολυμορφισμός που συσχετίσαμε με τα επίπεδα της Apo-B ήταν ο A-922G στο γονίδιο NOS, ο οποίος δεν έχει μελετηθεί αρκετά μέχρι σήμερα. Αναλυτικότερα, οι φορείς του αλληλομόρφου A παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα Apo-B. Σε ασθενείς με σπασμό της στεφανιαίας έχει γίνει ανάλυση για τους πολυμορφισμούς T-786C, A-922G και T-1486A. Αν και οι τρεις πολυμορφισμοί ήταν συνδεδεμένοι (linked) μεταξύ τους, μόνο ο T-786C συσχετίστηκε με σπασμό της στεφανιαίας αρτηρίας. Πειράματα με χρήση λουσιφεράσης ως γονίδιο αναφοράς, έδειξαν ότι η τα αλληλόμορφα που περιείχαν τους τρεις παραπάνω πολυμορφισμούς είχαν μειωμένη μεταγραφική ικανότητα, σε σύγκριση με μάρτυρες που είχαν τις φυσιολογικές αλληλουχίες. Επιπλέον πειράματα, έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός T-786C μειώνει τη λειτουργικότητα του υποκινητή τουλάχιστον στο μισό, σε σχέση με την φυσιολογική αλληλουχία, αντίθετα οι πολυμορφισμοί A-922G και T-1468A δεν είχαν καμία επίδραση (Koller et al., 1989). Σε δείγμα 2792 ανδρών από τη Μεγάλη Βρετανία, ο πολυμορφισμός A-922G δεν βρέθηκε να επηρεάζει τη συχνότητα εμφάνισης ισχαιμικών επεισοδίων αλλά ούτε και άλλους παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα και τα επίπεδα NO στο πλάσμα (Brown et al., 1998). Η πιο πρόσφατη αναφορά συσχετίζει τον πολυμορφισμό A-922G σε συνδυασμό με τον G894T και τον δείκτη ινσουλινοευαισθησίας (van't Hoof et al., 1999).

Τα αποτελέσματα της μελέτης για τους πολυμορφισμούς PON2 Ser311Cys, LPL Asn291Ser, PAI-1 T11053G, β FGG G-455A και NOS A-922G, δείχνουν ότι παρά τη μεγάλη επίδραση των μεταλλάξεων του *LDLR* στα επίπεδα της LDL-C, τα επίπεδα λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα της Apo-B επηρεάζονται και από άλλα γονίδια (Choumerianou et al., 2006). Αν και η FH περιγράφεται ως μονογονιδιακή ασθένεια, τα παραπάνω αποτελέσματα υπογραμμίζουν την πολλαπλή και πολύπλοκη αλληλεπίδραση γονιδίων στον προσδιορισμό του φαινότυπου σε ασθενείς με FH. Οι γενετικές παραλλαγές των γονιδίων που οδηγούν σε τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν μπορεί να επηρεάζουν τη λειτουργικότητα τους *in vivo* και στη συνέχεια τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα. Εναλλακτικά, κάθε πολυμορφική περιοχή σε ένα τέτοιο γονίδιο μπορεί να συνδέεται (in linkage disequilibrium) με μια σοβαρή μετάλλαξη στο υποψήφιο γονίδιο (Choumerianou et al., 2006).

Το τελευταίο γονίδιο που επιλέξαμε να μελετήσουμε είναι το ANP, το οποίο

έχει μεγάλη επίδραση στην CAD (Levin et al., 1998, Kragelund et al., 2005). Αυξημένα επίπεδα ANP έχουν παρατηρηθεί σε άτομα μετά από εγκεφαλικό επεισόδιο (Estrada et al., 1994). Οι Kragelund et al., μελέτησαν τη σχέση μεταξύ των επιπέδων του αμινοτελικού προ-B τύπου NP (NT-pro-BNP) και τη θνησιμότητα σε μεγάλο αριθμό ασθενών με σταθερή CAD. Τα επίπεδα του NT-pro-BNP ήταν πολύ χαμηλότερα σε ασθενείς που επέζησαν σε σχέση με εκείνους που απεβίωσαν, γεγονός που αποδίδει στο NT-pro-BNP χαρακτηριστικά ενός δείκτη που σχετίζεται με την μακροχρόνια επιβίωση σε ασθενείς με CAD (Kragelund et al., 2005).

Η συχνότητα του πολυμορφισμού ANP G664A που βρήκαμε (0.04) είναι παρόμοια με άλλων μελετών (Choumerianou et al., 2006) (**Πίνακας 4.2**). Δεν βρήκαμε καμία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού ANP G664A και της συχνότητας εμφάνισης CAD (Dedoussis et al., 2006). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε Γιαπωνέζους, όπου δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του G664A και της υπέρτασης (Kato et al., 1999) και τα εγκεφαλικά επεισόδια (Kato et al., 2001). Όμοια, σε Καυκάσιους, ο πολυμορφισμός δεν συσχετίστηκε με εγκεφαλικά επεισόδια (Hassan et al., 2001). Αντίθετα, στη μελέτη Physician's Health Study, αναφέρεται αύξηση της συχνότητας κατά δύο φορές εμφάνισης εγκεφαλικού, στους φορείς του πολυμορφισμού, ανεξάρτητα από την ύπαρξη υπέρτασης, παχυσαρκίας και διαβήτη (Rubattu et al., 2004).

Η ίδια ομάδα των Rubattu et al., συσχέτισε την ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο C στη θέση 2238 με 4.5 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εγκεφαλικού, σε δείγμα από τη Σαρδηνία (Rubattu et al., 1999, Rubattu et al., 2004). Ο ίδιος πολυμορφισμός T2238C συσχετίστηκε πρόσφατα με ιστορικό MI και στεφανιαία αθηροσκλήρυνση σε Πολωνούς ασθενείς με σταθερή CAD (Gruchala et al., 2003). Υψηλότερη συχνότητα του αλληλομόρφου C αναφέρεται στην ίδια μελέτη (0.4) σε σχέση με την συχνότητα προκύπτει από τη δική μας μελέτη (0.16) (Dedoussis et al., 2006). Όμοια συχνότητα με αυτή των ασθενών με FH προκύπτει από μελέτη σε υγιείς Ιταλούς (0.19) (Nannipieri et al., 2001). Οι συχνότητες του αλληλομόρφου C σε μελέτη δείγματος από τη Σαρδηνία είναι 0.2 σε ασθενείς που είχαν υποστεί εγκεφαλικό επεισόδιο και 0.15 σε υγιείς μάρτυρες. Οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά κριτήρια επιλογής των συμμετεχόντων αλλά και στη διαφορετική καταγωγή τους (Barley et al., 1991, Ramasawmy et al., 1992).

Αν και στην παρούσα μελέτη ο πολυμορφισμός G664A δεν βρέθηκε να συνδέεται με την CAD, βρήκαμε ότι οι ετεροζυγώτες παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα Apo-AI και HDL-C (Dedoussis et al., 2006). Η σχέση του ANP με τα επίπεδα της Apo-AI και της HDL-C μελετήθηκε πρόσφατα (Maioli et al., 2001). Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η διαφορική πρόσδεση των μικρών και μεσαίων σωματιδίων HDL στο

ANP μπορεί να οδηγεί σε έκθεση μεγάλου αριθμού υδροφοβικών τμημάτων στα μικρά σωματίδια της HDL, λόγω της απομάκρυνσης λιπιδίων κατά την αλλαγή της δομής της (Maioli et al., 2001). Τα χαμηλότερα επίπεδα LDL-C που παρατηρήθηκαν μπορούν να αποδοθούν στον τύπο της μετάλλαξης του *LDLR* καθώς ο τύπος της μετάλλαξης επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα της LDL-C (Dedoussis et al., 2004). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και άλλα γονίδια που δεν μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και συμμετέχουν στη μείωση των λιπιδίων στους ασθενείς με FH (Carmena-Ramon et al., 1998).

Πίνακας 4.2. Σύνοψη μελετών που έχουν γίνει για τη συσχέτιση του πολυμορφισμού ANP G664A με καρδιοεγκεφαλική νόσο.

Αναφορά	Rubattu et al., 1999	Kato et al., 2000	Hassan et al., 2001	Kato et al., 2002
Πληθυσμός	Physician's Health Study Ανδρες (λευκοί) 348 ασθενείς με εγκεφαλικό 348 μάρτυρες	Γιαπωνέζοι 1 ^ο : 179 υγιείς 2 ^ο : 102 υγιείς 3 ^ο panel: 255 υπερτασικοί και 225 φυσιολογικοί	436 Καυκάσιοι με ισχαιμική καρδιοεγκεφαλική νόσο και 295 μάρτυρες	Γιαπωνέζοι 1 ^ο : 270 άτομα με εγκεφαλικό και 350 μάρτυρες 2 ^ο : 178 ασθενείς και 163 μάρτυρες
Συχνότητα αλληλομόρφου A:	Ασθενείς 11.6% Μάρτυρες 6.5%	στο 1 ^ο : 9%	Ασθενείς 4.8% Μάρτυρες 4.9%	1 ^ο : Ασθενείς 8.0% Μάρτυρες 8.9% 2 ^ο : Ασθενείς 6.8% - 8.7% Μάρτυρες 11.7%
Αποτελέσματα:	Συσχέτιση του αλληλομόρφου A με την εμφάνιση εγκεφαλικού (OR=2.0, 95%CI 1.17-3.19, p=0.01).	2 ^ο : καμία συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμού και επιπέδων ANP 3 ^ο : καμία συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμού και υπέρτασης.	Καμία συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμού και εγκεφαλικού επεισοδίου	Καμία συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμού και εγκεφαλικού επεισοδίου και στα 2 δείγματα

4.4 Συμπεράσματα

Από τη συζήτηση των ευρημάτων αλλά και τη σύγκρισή τους με τα υπάρχοντα δεδομένα μέχρι σήμερα από άλλες μελέτες, προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

1. Ο Ελληνικός πληθυσμός είναι ομοιογενής ως προς τις μεταλλάξεις που εμφανίζονται στον *LDLR* και δεν παρουσιάζει μεταλλάξεις στο γονίδιο *ApoB*. Η FH στην Ελλάδα οφείλεται σε 17 μεταλλάξεις, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις περιπτώσεις όπου ανιχνεύεται μετάλλαξη με την παρούσα μεθοδολογία. Το γεγονός αυτό καθιστά ευκολότερη τη μελλοντική εφαρμογή γενετικής διάγνωσης.
2. Οι συχνές μεταλλάξεις στον *LDLR* παρουσιάζουν γεωγραφική κατανομή. Ειδικότερα, η V408M είναι πιο συχνή στην Κεντρική Δυτική Ελλάδα και την περιοχή του Αγρινίου, και η μετάλλαξη C6W βρέθηκε σε ασθενείς που κατάγονται από την Κεντρική Ανατολική Ελλάδα και τη περιοχή της Λαμίας. Σε πιθανή εφαρμογή γενετικής διάγνωσης μπορεί να λαμβάνεται υπ' όψιν και η καταγωγή του ασθενούς.
3. Μεταξύ των 17 μεταλλάξεων, υπάρχει μια πρωτοαναφερόμενη έλλειψη ενός νουκλεοτιδίου στον υποκινητή που μειώνει την έκφραση του *LDLR* σε 5% και τη λειτουργικότητα του κατά 76%.
4. Οι φορείς μετάλλαξης αρνητικού υποδοχέα έχουν υψηλότερα επίπεδα TC και LDL-C και 6 φορές μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ξανθωμάτων. Η εμφάνιση CAD ήταν 2 φορές μεγαλύτερη στην ομάδα με μετάλλαξη στον *LDLR* σε σύγκριση με την ομάδα χωρίς μετάλλαξη. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι ο γονότυπος του *LDLR* επηρεάζει τον φαινότυπο της FH.
5. Ο γονότυπος της *ApoE*, τουλάχιστον στον πληθυσμό που μελετήθηκε, δεν επηρεάζει τα επίπεδα λιπιδίων αλλά ούτε και τη συχνότητα εμφάνισης CAD.
6. Οι πολυμορφισμοί Ser311Cys, Asn291Ser, T11053G, G-455A και A-922G στα γονίδια PON-2, LPL, PAI-1, FGB και NOS αντίστοιχα, επηρεάζουν τα επίπεδα της Apo-B.
7. Ο πολυμορφισμός ANP G664A επηρεάζει τα επίπεδα της HDL-C και της Apo-AI.

4.5 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα και εφαρμογές

Το γενετικό υπόβαθρο του *LDLR* στον ελληνικό πληθυσμό επιτρέπει την εφαρμογή γενετικής διάγνωσης. Εάν λάβουμε υπ' όψιν ότι ο γονότυπος του *LDLR* επηρεάζει το φαινότυπο της FH και πιθανό και την ανταπόκριση στη θεραπεία, η γενετική διάγνωση όχι μόνο μπορεί να προσφέρει μια ξεκάθαρη εικόνα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που τα κλινικά χαρακτηριστικά δεν είναι επαρκή, αλλά μπορεί να συμβάλλει στην έγκαιρη και αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση.

Ένα από τα σημαντικότερα θέματα για την εφαρμογή της αλυσιδωτής γενετικής εξέτασης είναι η οικονομική της κάλυψη. Παρά το ότι πρόσφατες μελέτες

έχουν δείξει τα οικονομικά οφέλη που προκύπτουν από την έγκαιρη διάγνωση της FH (αποφυγή καρδιακών επεισοδίων από την έγκαιρη διάγνωση και έγκαιρη θεραπεία) τα οποία κυμαίνονται στο ίδιο ύψος με άλλα διαγνωστικά προγράμματα (πχ. μαστογραφία), η FH και η CAD δεν έχουν το ίδιο “προφίλ” με τον καρκίνο (Marks et al., 2002, Wondering et al., 2004) και προς το παρόν στην Ελλάδα τα έξοδα δεν καλύπτονται από το σύστημα υγείας. Η εφαρμογή της αλυσιδωτής γενετικής ανάλυσης απαιτεί υποδομή που θα επιτρέπει όχι μόνο τον επαρκή εντοπισμό των οικογενειών αλλά και την κλινική υποστήριξή τους εφόσον είναι αναγκαία. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με τη συνεργασία των ήδη υπαρχόντων λιπιδαιμικών κλινικών και γενετικών συμβούλων.

Η διάγνωση της FH στον γενικό πληθυσμό προτείνεται να γίνεται αρχικά με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά (Marks et al., 2000) και εκείνοι που έχουν τις μεγαλύτερες πιθανότητες να νοσήσουν να επιλέγονται για γενετική ανάλυση και να αποτελούν τη βάση για αλυσιδωτή γενετική εξέταση στις οικογένειες. Η αλυσιδωτή γενετική ανάλυση έχει πλεονεκτήματα για την υγεία των συμμετεχόντων, έχει οικονομικά οφέλη, χωρίς να προκαλεί ψυχολογικά και κοινωνικά προβλήματα. Η πιθανότητα εύρεσης ετεροζυγωτών είναι 50% για κάθε συγγενή πρώτου βαθμού ατόμου στον οποίο ήδη έχει βρεθεί μετάλλαξη, ενώ όσο μειώνεται ο βαθμός συγγένειας το ποσοστό αυτό μικραίνει.

Γενικά, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για το αν τα γονίδια που μελετήθηκαν πέρα του *LDLR*, δρουν μεμονωμένα στη διαμόρφωση των επιπέδων λιπιδίων ή αν δρουν συνεργιστικά και παράλληλα ή ανεξάρτητα από άλλους κλασσικούς παράγοντες κινδύνου. Το ερώτημα είναι τι συμβαίνει όταν ένα άτομο έχει κληρονομήσει ένα προστατευτικό αλληλόμορφο σε ένα γενετικό τόπο και ένα προδιαθεσικό αλληλόμορφο σε ένα άλλο. Έχουν αναφερθεί κάποια παραδείγματα αλληλεπίδρασης γονιδίου-γονιδίου (Tiret et al., 1994b) οπότε θα ήταν σκόπιμο να γίνεται γενετική ανάλυση γι’ αυτούς τους συνδυασμούς (απλότυπους), εφόσον έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τα επίπεδα λιπιδίων σε μεγάλο βαθμό.

Διαφορετικές μεταλλάξεις στον *LDLR* μπορεί να έχουν διαφορετική επίδραση στον φαινότυπο. Καθώς όμως συνεχώς αναπτύσσονται νέα διαγνωστικά μέσα μπορεί παράλληλα να αυξηθεί και η ακρίβεια με την οποία προβλέπεται η προδιάθεση ενός ατόμου για την εμφάνιση CAD λόγω μεταλλάξεων στον *LDLR*. Τα επόμενα χρόνια αναμένεται να είναι διαθέσιμα τεχνικά μέσα (πχ. DHPLC) σε περισσότερα εργαστήρια που θα συμβάλλουν στην αύξηση της ευαισθησίας της αλλά και της ταχύτητας εύρεσης μετάλλαξης. Η μείωση του κόστους τεχνικών όπως η DHPLC (Gross et al., 1999, Jones et al., 1999) και οι μικροσυστοιχίες (Tang et al.,

1999) και η εφαρμογή τους θα διευκολύνει την ανάλυση ολόκληρης της αλληλουχίας του *LDLR* σε κάθε περίπτωση.

Οι ασθενείς με FH έχουν 9 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα για να εμφανίσουν πρόωρη CAD (Scientific Steering Committee of the Simon Broome Register Group). Όπως φαίνεται υπάρχουν και άλλα γονίδια εκτός του *LDLR* και *ApoB* που επηρεάζουν άμεσα την πιθανότητα αυτή αλλά και διαμέσου της τροποποίησης των επιπέδων των λιπιδίων. Σε ερευνητικό επίπεδο, η μελέτη μεγάλου αριθμού οικογενειών θα βοηθήσει στο να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο ρόλος άλλων γονιδίων στην εκδήλωση της νόσου. Επιπλέον, η δημιουργία απλοτύπων μπορεί να διευκρινίσει με ποιο τρόπο οι ασθενείς που φέρουν συγκεκριμένο τύπο μεταλλάξεων στον *LDLR*, σε συνδυασμό με άλλους πολυμορφισμούς, ανταποκρίνονται διαφορετικά στη θεραπεία.

Εξάλλου, αναμένεται να γίνει εφικτή η θεραπεία της νόσου με νέες μεθόδους. Αν και οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές είναι αποτελεσματικές, σε πολλούς ασθενείς, κυρίως ομοζυγώτες, δεν επιτυγχάνονται τα προτεινόμενα επίπεδα λιπιδίων. Η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να οπλίσει τους θεράποντες με ένα δυνατό μέσο αντιμετώπισης της νόσου. Σε πειραματικό επίπεδο, η γονιδιακή θεραπεία έχει ήδη εφαρμοστεί σε πέντε ασθενείς με περιορισμένα αποτελέσματα (Grossman et al., 1995). Υπάρχει προοπτική η μέθοδος αυτή να αποτελέσει ένα τρόπο θεραπείας στο μέλλον εφόσον ακολουθήσουν μελέτες που θα εξασφαλίσουν την ασφάλεια στην εφαρμογή της και τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητά της. Όπως κι αν έχει, για την εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας, είναι σημαντική η γνώση των μεταλλάξεων στους διάφορους πληθυσμούς και σε κάθε ασθενή χωριστά, μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την εφαρμογή γενετικής διάγνωσης.

Προς το παρόν εάν η διάγνωση της FH, που προκαλείται από μετάλλαξη στα γονίδια *LDLR* και *ApoB*, γίνεται με μεθόδους μοριακής γενετικής είναι αναγκαία η ενημέρωση των ατόμων που εξετάζονται, και η συνεχιζόμενη παρακολούθηση καθώς ένα αρνητικό αποτέλεσμα για μετάλλαξη δεν σημαίνει απουσία μετάλλαξης γενικότερα, ούτε αποκλείει την πιθανότητα εμφάνισης CAD από άλλα αίτια.

Για το λόγο αυτό η φράση “θεραπεία στο φαινότυπο αλλά συμβουλευτική στο γονότυπο” (Humphries et al., 1997) είναι πολύ επίκαιρη, και δεν πρέπει να θεωρούμε ότι οι ασθενείς με φαινότυπο FH και άγνωστο γονότυπο έχουν μειωμένο κίνδυνο για εμφάνιση CAD σε σχέση με εκείνους που έχουν γνωστό γονότυπο, καθώς οι περισσότερες μελέτες νοσηρότητας και θνησιμότητας έχουν γίνει σε ασθενείς που εντοπίστηκαν με βάση τα κλινικά και όχι τα γενετικά χαρακτηριστικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003; **34**: 154-6.
2. Act relating to the application of biotechnology in medicine, Law no. 56 of 5 August 1994.
3. Albhom A, Norell S. Εισαγωγή στην σύγχρονη επιδημιολογία. Εκδόσεις Λίτσας. 1992.
4. Alonso R, Castillo S, Civeira F, Puzo J, La Cruz JJ, Pocovi M, Mata M. Heterozygous familial hypercholesterolemia in Spain. Description of 819 non related cases. *Med Clin. (Barc).* 2002; **118**: 487-92.
5. Amsellem S, Briffaut D, Carrié A, Rabès J-P, Girardet J-P, Fredenrich A, et al. ntronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet.* 2002; **111**: 501-10.
6. Amudsen AL, Ose L, Nenseter MS, Ntanios F. Plant sterol ester-enriched spread lowers plasma total and LDL cholesterol in children with familial hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* 2002; **76**: 338-44.
7. Andersen GE, Lous P, Friis-Hansen B. Screening for hyperlipoproteinemia in 10,000 Danish newborns. Follow-up studies in 522 children with elevated cord serum VLDL-LDL-cholesterol. *Acta Paediatr Scand.* 1979; **68**: 541-5.
8. Andersen LK, Jensen HK, Juul S, Faergeman O. Patients' attitudes toward detection of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arch Intern Med.* 1997; **157**: 553-60.
9. Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; **73**: 2434-8.
10. Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature.* 1977; **270**: 695-9.

11. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Genetic Causes of Monogenic Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: A HuGE Prevalence Review. *Am J Epidemiol.* 2004; **160**: 407-20.
12. Bambauer R, Olbriht CJ, Schoeppe E. Low density lipoprotein apheresis for prevention and regression of atherosclerosis of clinical results. *Ther Apher.* 1997; **1**: 242-8.
13. Barbir M, Wile D, Trayner I, Aber VR, Thomson GR. High prevalence of hypertriglyceridaemia and apolipoprotein abnormalities in coronary artery disease. *Br Heart J.* 1988; **60**: 397-403.
14. Barley J, Carter ND, Cruickshank JK, Jeffery S, Smith A, Charlett A, et al. Renin and atrial natriuretic peptide restriction fragment length polymorphisms: association with ethnicity and blood pressure. *J Hypertens.* 1991; **9**: 993-6.
15. Baron H, Fung S, Aydin A, Bahring S, Luft FC, Schuster H. Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat Biotechnol.* 1996; **14**: 1279-82.
16. Bhatnagar D, Morgan J, Siddiq S, Mackness MI, Miller JP, Durrington PN. Outcome of case finding among relatives of patients with known heterozygous familial hypercholesterolemia. *BMJ.* 2000; **321**: 1-5.
17. Berenson GS, Srinivasan SR, Freedman DS, Radhakrishnamurthy B, Dalferes ER. Atherosclerosis and its evolution in childhood. *Am J Med Sci.* 1987; **294**: 429-40.
18. Bersot TP, Russell SJ, Thatcher SR, Pomernacki NK, Mahley RW, Weisgraber KH, et al. A unique haplotype of the apolipoprotein B-100 allele associated with familial defective apolipoprotein B-100 in a Chinese man discovered during a study of the prevalence of this disorder. *J Lipid Res.* 1993; **34**: 1149-54.
19. Bertolini S, Cassanelli R, Garuti M, Ghisellini M, Simone ML, Roller M, et al. Analysis of LDL receptor gene mutations in Italian patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; **19**: 408-18.
20. Bertolini S, Cantafora A, Aversa M, Cortese S, Motti C, Martini S, et al. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL

- receptor gene that cause a receptor-negative phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; **20**: e41-e52.
21. Bertolini S, Pisciotta L, Di Scala L, Langheim S, Bellocchio A, Masturzo P, et al. Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2004; **174**: 57-65.
 22. Bilheimer DW, Ho YK, Brown MS, Anderson RG, Goldstein JL. Genetics of the low density lipoprotein receptor. Diminished receptor activity in lymphocytes from heterozygotes with familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1978; **61**: 678-96.
 23. Bilheimer DW, Stone NJ, Grundy SM. Metabolic studies in familial hypercholesterolemia. Evidence for a gene-dosage effect in vivo. *J Clin Invest.* 1979; **64**: 524-33.
 24. Bilheimer DW. Portacaval shunt and liver transplantation in treatment of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis.* 1989; **1**: 158-63.
 25. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45: identity of K-45 paraoxonase. *Eur J Biochem.* 1993; **211**: 871-9.
 26. Bochmann H, Gehrisch S, Jaross W. Fast amplification of the low density lipoprotein receptor gene and detection of a large deletion by means of long polymerase chain reaction. *Eur J Clin Chem Biochem.* 1996; **34**: 955-9.
 27. Boerwinkle E, Utermann G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet.* 1988; **42**: 104-22.
 28. Bovet P, Danioli R, Essinger A, Golay A, Sigwart U, Kappenberger L. Phospholipids and other lipids in angiographically assessed coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 1989; **80**: 41-7.
 29. Brewer HB Jr, Zech LA, Gregg RE, Schwartz D, Schaefer EJ. Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann Intern Med.* 1983; **98**: 623-40.

30. Brorholt-Petersen JU, Jensen HK, Raungaard B, Gregersen N, Faergeman O. LDL-receptor gene mutations and the hypocholesterolemic response to statin therapy. *Clin Genet.* 2001; **59**: 397-405.
31. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973; **70**: 2162-6.
32. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1974; **249**: 789-96.
33. Brown MS, Goldstein JL. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell.* 1975; **3**: 307-16.
34. Brown MS, Goldstein JL. Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell.* 1976; **9**: 663-74.
35. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest.* 1983; **72**: 743-7.
36. Brown MS, Goldstein JL. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. Phys. Med. Nobel Lecture. 1985; 284-323.
37. Brown ET, Fuller GM. Detection of a complex that associates with the β fibrinogen G-455-A polymorphism. *Blood.* 1998; **92**: 3286-93.
38. Bucher NL, Overath P, Lynen F. beta-Hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1960; **40**: 491-501.
39. Bunn CF, Lintott CJ, Scott RS, George PM. Comparison of SSCP and DHPLC for the detection of LDLR mutations in a New Zealand cohort. *Hum Mutat.* 2002; **19**: 311.
40. Carmena-Ramon RF, Ordovas JM, Ascaso JF, Real J, Priego MA, Carmena R. Influence of genetic variation at the apo A-I gene locus on lipid levels and

- response to diet in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1998; **139**: 107-13.
41. Carmena-Ramon R, Real JT, Ascaso JF, Ordovas JM, Carmena R. Effect of apolipoprotein E genotype on lipid levels and response to diet in familial hypercholesterolemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2000; **10**: 7-13.
 42. Cathcart MK, Chisolm GM, McNally AKI, Morel DW. Oxidative modification of low density lipoprotein LDL by activated monocytes and the cell lines U937 and HL60. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1988; **24**: 1001-8.
 43. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; **340**: 1111-15.
 44. Chan P-C, Edwards A, Lafreniere R, Parson HG. Improved detection of familial hypercholesterolemia by determining low-density lipoprotein receptor expression in mitogen-induced proliferating lymphocytes. *J Lipid Res*. 1998; **39**: 2261-70.
 45. Chaves FJ, Real JT, Garcia-Garcia AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL, and high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; **86**: 4926-32.
 46. Chang R, Yang E, Chamblis D, Kumar A, Wise J, Mehta KD. In vivo role of the Sp1 site neighboring sterol-responsive element-1 in controlling low-density lipoprotein receptor gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; **218**: 733-9.
 47. Cheng S, Pallaud C, Grow MA, Scarf SJ, Erlich HA, Klitz W, et al. A multilocus genotyping assay for cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*. 1998; **36**: 561-6.
 48. Cheng S, Grow MA, Pallaud C, Klitz W, Erlich HA, Visvikis S, et al. A multilocus genotyping assay for candidate markers of cardiovascular disease. *Genome Res*. 1999; **9**: 936-49.

49. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med.* 2000; **28**: 1815-26.
50. Choumerianou DM, Dedoussis GVZ. Familial Hypercholesterolemia and Response to Statin Therapy According to *LDLR* Genetic Background. *CCLM.* 2005; **43**: 793-801.
51. Choumerianou DM, Maumus S, Skoumas J, Pitsavos C, Stefanadis C, Visvikis-Siest S, Dedoussis GVZ. Polymorphisms associated with Apolipoprotein B levels in Greek patients with Familial Hypercholesterolemia. *CCLM.* 2006; Υπό Δημοσίευση.
52. Cleghorn CL, Skcaff CM, Mann J, Chisholm A. Plant sterol-enriched spread enhances the cholesterol-lowering potential of the fat-reduced diet. *Eur J Clin Nutr.* 2003; **57**: 170-6.
53. Committee for the Study of Inborn Errors of Metabolism: Genetic screening: programs, principles and research. Washington, DC: *National Academy of Sciences*; 1975.
54. Cotton RG, Scriver CR. Proof of “disease causing” mutation. *Hum Mutat.* 1998; **12**: 1-3.
55. Connor SL, Connor WE. Coronary heart disease: Prevention and treatment by nutritional change. In:Caroll KK, ed, Canadian Royal Society of Medical Symposium. Montreal: McGill-Queens Univerity Press, Montreal, 1990; 33-72.
56. Cooper DN, Krawczak M. Splice site mutations. In Human Gene Mutation. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 1993; 239-60.
57. Couture P, Brun LD, Szots F, Lelievre M, Gaudet D, Despres JP, et al. Association of specific LDL receptor gene mutations with differential plasma lipoprotein response to simvastatin in young French Canadians with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; **18**: 1007-12.
58. Cumming AM, Robertson FW. Polymorphism at the apoprotein-E locus in relation to risk of coronary disease. *Clin Genet.* 1984; **25**: 310-3.

59. Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, et al. Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1983; **258**: 15261-73.
60. Damgaard D, Jensen JM, Larsen ML, Soerensen VR, Jensen HK, Gregersen N, et al. No genetic linkage or molecular evidence for involvement of the PCSK9, ARH or CYP7A1 genes in the Familial Hypercholesterolemia phenotype in a sample of Danish families without pathogenic mutations in the LDL receptor and apoB genes. *BMC Med Genet.* 2005; **20**: 6-15.
61. Damgaard D, Nissen PH, Jensen LG, Nielsen GG, Stenderup A, Larsen ML, et al. Detection of large deletions in the LDL- receptor gene with quantitative PCR methods. *Atherosclerosis.* 2004; **177**: 415-22.
62. Davidson MH. Combination therapy for dyslipidemia: safety and regulatory considerations. *Am J Cardiol.* 2002; **90**: 50K-60K.
63. Davidson MH, McGarry T, Bettis R, Melani L, Lipka LJ, LeBeaut AP, et al. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002; **40**: 2125-34.
64. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1988; **8**: 1-21.
65. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1988; **8**: 1-21.
66. Descamps OS, Gilbeau J-P, Luwaert R, Heller FR. Impact of genetic defects on coronary atherosclerosis in patients suspected of having familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest.* 2003; **33**: 1-9.
67. Dedoussis GV, Pitsavos C, Kelberman D, Skoumas J, Prassa ME, Choumerianou DM, et al. FH-Pyrgos: a novel mutation in the promoter (-45delT) of the low-density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet.* 2003; **64**: 414-9.
68. Dedoussis GV, Genschel J, Bochow B, Pitsavos C, Skoumas J, Prassa M, et al. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in German and Greek patients. *Hum Mutat.* 2004a; **23**: 285-6.

69. Dedoussis GV, Skoumas J, Pitsavos C, Choumerianou DM, Genschel J, Schmidt H, et al. FH clinical phenotype in Greek patients with LDL-R defective vs. negative mutations. *Eur J Clin Invest*. 2004b; **34**: 402-9.
70. Dedoussis GVZ, Maumus S, Skoumas J, Choumerianou DM, Pitsavos C, Stefanadis C, Visvikis-Siest S. Natriuretic peptide Val7Met substitution and risk of coronary artery disease in Greek patients with Familial Hypercholesterolemia. *J Lab Clin An*. 2006; Υπό δημοσίευση.
71. Defesche J. Familial Hypercholesterolemia. In: Betteridge J. editor Lipids and vascular disease. Vol 6. London: Martin Dunitz. 2000; 65-76.
72. de Jongh S, Kerckhoffs MC, Grootenhuys MA, Bakker HD, Heymans HS, Last BF. Quality of life, anxiety and concerns among statin-treated children with familial hypercholesterolaemia and their parents. *Acta Paediatr*. 2003; **92**: 1096-101.
73. de Maat MP, Kastelein JJ, Jukema JW, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, et al. -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; **18**: 265-71.
74. de Sauvage Nolting PR, Buirma RJ, Hutten BA, Kastelein JJ; Dutch EXPRESS Investigator Group. Two-year efficacy and safety of simvastatin 80 mg in familial hypercholesterolemia (the Examination of Probands and Relatives in Statin Studies With Familial Hypercholesterolemia [EXPRESS FH]). *Am J Cardiol*. 2002; **90**: 181-4.
75. Doevendans PA, Jukema W, Spiering W, Defesche JC, Kastelein JJ. Molecular genetics and gene expression in atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2001; **80**: 161-72.
76. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet*. 1991; **338**: 1546-50.
77. Dujovne CA, Ettinger MP, McNeer JF, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, et al. Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of a potent new selective

- cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2002; **90**: 1092-7.
78. Durrington PN. Familial hypercholesterolemia. In: Durrington PN, Editor. *Hyperlipidaemia: Diagnosis management.* Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.1995; 108-40.
 79. Ekstrom U, Abrahamson M, Wallmark A, Floren CH, Nilsson-Ehle P. Mutations in the low-density lipoprotein receptor gene in Swedish familial hypercholesterolaemia patients: clinical expression and treatment response. *Eur J Clin Invest.* 1998; **28**: 740-7.
 80. Ellsworth DL, Sholinsky P, Jaquish C, Fabsitz RR, Manolio TA. Coronary heart disease. At the interface of molecular genetics and preventive medicine. *Am J Prev Med.* 1999; **16**: 122-33.
 81. Esser V, Limbird LE, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1988; **263**: 13282-90.
 82. Estrada V, Tellez MJ, Moya J, Fernandez-Durango R, Egido J, Fernandez Cruz AF. High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens.* 1994; **7**: 1085-9.
 83. EUROASPIRE II Study Group. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries. Principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Prigram. *Eur Heart J.* 2001; **22**: 554-72.
 84. Fadul JEM, Vessby B, Wickstrom B, Danielson BG. Treatment of homozygous familial hypercholesterolemia with low density lipoprotein apheresis: a 4 year follow up study. *Artif Organs.* 1997; **21**: 364-8.
 85. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL, CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001; **108**: 785-91.
 86. Ferrieres J, Lambert J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL receptor gene mutation. *Circulation.* 1995; **92**: 290-5.

87. Fieseler HG, Armstrong VW, Wieland E, Thiery J, Schutz E, Walli AK, et al. Serum Lp(a) concentrations are unaffected by treatment with the HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin: results of a 2-year investigation. *Clin Chim Acta*. 1991; **204**: 291-300.
88. Fisher HJ, Schuster H, Keller C, Wolfram G, Zollner N. Identification of a 76-year old analysis in diagnosis of familial hypercholesterolemia by haplotype analysis of the LDL receptor gene. *Klin Wochenschr*. 1991; **69**: 842-6.
89. Fischer SG, Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*. 1979; **16**: 191-200.
90. Fisher RM, Humphries SE, Talmaud PJ. Common variation in the lipoprotein lipase gene: effects on plasma lipids and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1997; **135**: 145-59.
91. Fouchier SW, Defesche JC, Umans-Eckenhausen MW, Kastelein JP. The molecular basis of familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Hum Genet*. 2001; **109**: 602-15.
92. Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; **81**: 2826-30.
93. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*. 2002; **16**: 307-16.
94. Funatsu T, Suzuki K, Goto M, Arai Y, Kakuta H, Tanaka H, et al. Prolonged inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin inhibits apo B-100 and triglyceride secretion from HepG2 cells. *Atherosclerosis*. 2001; **157**: 107-15.
95. Gaddi A, Arca M, Ciarrocchi A, Fazio S, D'Alo G, Tiozzo R, et al. Pravastatin in heterozygous familial hypercholesterolemia: low-density lipoprotein (LDL) cholesterol-lowering effect and LDL receptor activity on skin fibroblasts. *Metabolism*. 1991; **40**: 1074-8.
96. Gaffney D, Reid JM, Cameron IM, Vass K, Caslake MJ, Shepherd J, et al. Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are

- associated with hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; **15**: 1025-29.
97. Gagne C, Bays HE, Weiss SR, Mata P, Quinto K, Melino M, et al. Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2002; **90**: 1084-91.
 98. Gaudet D, Vohl MC, Couture P, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, et al. Contribution of receptor negative versus receptor defective mutations in the LDL-receptor gene to angiographically assessed coronary artery disease among young (25-49 years) versus middle-aged (50-64 years) men. *Atherosclerosis.* 1999; **143**: 153-61.
 99. Genest J. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. *J Inherit Metab Dis.* 2003; **26**: 267-87.
 100. Giesel J, Holzem G, Oette K. Screening for mutations in exon 4 of the LDLR gene in a German population with severe hypercholesterolemia. *Hum Genet.* 1995; **228**: 823-25.
 101. Godard B, ten Kate L, Evers-Kiebooms G, Ayme S. Population genetic screening programmes: principles, techniques, practices, and policies. *Eur J Hum Genet.* 2003; **11**: S49–S87.
 102. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973; **70**: 2804-8.
 103. Goldstein JL, Brown MS. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem.* 1974a; **249**: 5153-62.
 104. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease II. Genetic analysis of lipid levels I 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1973b; **52**: 1544-68.

105. Goldstein JL, Dana SE, Brown MS. Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1974b; **71**: 4288-92.
106. Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beaudet AL, Brown MS. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem*. 1975; **250**: 8487-95.
107. Goldstein JL, Brown MS, Stone NJ. Genetics of the LDL receptor: evidence that the mutations affecting binding and internalization are allelic. *Cell*. 1977; **12**: 629-41.
108. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy. *Med Clin North Am*. 1982; **66**: 335-62.
109. Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol*. 1985; **1**: 1-39.
110. Goodnight SH Jr, Harris WS, Connor WE, Illingworth DR. Polysaturated fatty acids, hyperlipidemia and thrombosis. *Arteriosclerosis*. 1982; **2**: 87-113.
111. Graham CA, Ward AJ, Nevin NC, Trinick T, Young I, O'Kane M, et al. Automated sequencing has identified 70% of mutations in 30 patients with familial hypercholesterolemia in Northern Ireland. *Atherosclerosis*. 1995; **112**: 261-7.
112. Graham CA, McClean E, Ward AJM, Beattie ED, Martin S, O'Kane M, et al. Mutation screening and genotype:phenotype correlation in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 1999; **147**: 309-16.
113. Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. 1993; **34**: 1367-83.
114. Groen AK, Oude Elferink RP, Verkade HJ, Kuiper F. The ins and outs of reverse cholesterol transport. *Ann Med*. 2004; **36**: 135-45.

115. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet.* 1999; **105**: 72-8.
116. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nat Med.* 1995; **1**: 1148-54.
117. Gruchala M, Cieciewicz D, Wasag B, Targonski R, Dubaniewicz W, Nowak A, et al. Association of the Scal atrial natriuretic peptide gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Am Heart J.* 2003; **145**: 125-31.
118. Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res.* 1990; **31**: 1149-72.
119. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, et al. for the National Heart, Lung and Blood Institute, American College of Cardiology Foundation, and American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation.* 2004; **110**: 227-39.
120. Gudnason V, Sigurdsson G, Nissen H, Humphries SE. Common founder mutation in the LDL receptor gene causing familial hypercholesterolaemia in the Icelandic population. *Hum Mutat.* 1997; **10**: 36-44.
121. Guo X, Cheng S, Taylor KD, Cui J, Hughes R, Quinones MJ. Hypertension genes are genetic markers for insulin sensitivity and resistance. *Hypertension.* 2005; **45**: 799-803.
122. Gylling H, Siimes MA, Miettinen TA. Sitostanol ester margarine in dietary treatment of children with familial hypercholesterolemia. *J Lip Res.* 1995; **36**: 1807-12.
123. Hadfield SG, Humphries SE. Implementation of cascade testing for the detection of familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol.* 2005; **16**: 428-33.
124. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csazar A, et al. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet.* 1991; **49**: 338-49.

125. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, et al. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet.* 1999; **22**: 239-47.
126. Hansen PS, Norgaard-Petersen B, Meinertz H, Jensen HK, Hansen AB, Klausen IC, et al. Incidence of the apolipoprotein B-3500 mutation in Denmark. *Clin Chim Acta.* 1994; **230**: 101-4.
127. Hansen PS, Defesche JC, Kastellein JJ, Gerdes LU, Fraza L, Gerdes C, et al. Phenotypic variation in patients with familial hypercholesterolemia and defective apolipoprotein B (FDB) in three European Populations. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 1997; **17**: 826-33.
128. Havel RJ. Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1995; **6**: 312-6.
129. Havel RJ, Kane JP. Structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vall D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th edition. New York: Mc Graw Hill. 1995; 1841-51.
130. Hassan A, Ali N, Dong Y, Carter ND, Markus HS. Atrial natriuretic peptide gene G664A polymorphism and the risk of ischemic cerebrovascular disease. *Neurology.* 2001; **57**: 1726-8.
131. Heath KE, Gudnason V, Humphries SE, Seed M. The type of mutation in the low density lipoprotein receptor gene influences the cholesterol-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 1999; **143**: 41-54.
132. Heath KE, Gahan M, Whittall RA, Humphries S. Low-density lipoprotein receptor gene (LDL-R) world-wide website in familial hypercholesterolemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis.* 2001a; **154**: 243-6.
133. Heath KE, Humphries SE, Middleton-Price H, Boxer M. A molecular genetic service for diagnosing individuals with familial hypercholesterolemia (FH) in the United Kingdom. *Eur J Hum Genet.* 2001b; **9**: 244-52.

134. Heiberg A, Berg K. The inheritance of hyperlipoproteinaemia with xanthomatosis. A study of 132 kindreds. *Clin Genet*. 1976; **9**: 203-33.
135. Heinecke JW. Oxidized amino acids: culprits in human atherosclerosis and indicators of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2002; **32**: 1090-101.
136. Henry I, Uzan G, Weil D, Nicholas H, Kaplan JC, Marguerie G, et al. The genes coding for the A α , B β and g chain of fibrinogen map to 4q2. *Am J Hum Genet*. 1984; **36**: 760-68.
137. Henry M, Tregouet DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G, et al. Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: a family study with part of the Stanislas Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; **18**: 84-91.
138. Hill JS, Hayden MR, Frohlich J, Pritchard PH. Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*. 1991; **11**: 290-7.
139. Hixson JE. Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb*. 1991; **11**: 1237-44.
140. Ho YK, Brown S, Bilheimer DW, Goldstein JL. Regulation of low density lipoprotein receptor activity in freshly isolated human lymphocytes. *J Clin Invest*. 1976; **58**: 1465-74.
141. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*. 1990; **24**: 133-70.
142. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 1992; **1**: 445-66.
143. Hogue J-C, Lamarche B, Gaudet D, Tremblay AJ, Despres J-P, Gagne C, Couture P. Genotype mutant LDL receptor allele is associated with LDL particle size heterogeneity in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2006; **184**: 163-70.

144. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Group, Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, et al. Long term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 1998; **82L**: 1489-95.
145. Hollman G, Olsson AG, Ek A-C. Familial hypercholesterolemia and quality of life in family members. *Prev Med.* 2003; **36**: 569-74.
146. Hopkins PN. Familial hypercholesterolemia--improving treatment and meeting guidelines. *Int J Cardiol.* 2003; **89**: 13-23.
147. Howard BV, Gidding SS, Liu K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults. *Am J Epidemiol.* 1998; **148**: 859-68.
148. Humphries SE, Galton D, Nicholls P. Genetic testing for familial hypercholesterolaemia: practical and ethical issues. *Q J Med.* 1997; **90**: 169-81.
149. Humphries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day IN, Miller GJ. Apolipoprotein E4 and coronary heart disease in middle-aged men who smoke: a prospective study. *Lancet.* 2001; **358**: 115-9.
150. Hunninghake DB, Stein EA, Bremner WF, Greenland P, Demke DM, Oliphant TH. Dose—Response Study of Colestipol Tablets in Patients with Moderate Hypercholesterolemia. *Am J Ther.* 1995; **2**: 180-9.
151. Illingworth DR. New horizons in combination drug therapy for hypercholesterolemia. *Cardiology.* 1989; **76S**: 83-94;
152. Illingworth DR. How effective is drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia? *Am J Cardiol.* 1993; **72**: 54-8D.
153. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Rall SC Jr, Mahley RW. Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2. Evidence for modulation of the binding site conformation. *J Biol Chem.* 1984; **259**: 7261-7.
154. Inoue T, Hayashi M, Takayanagi K, Morooka S. Lipid-lowering therapy with fluvastatin inhibits oxidative modification of low density lipoprotein and improves

- vascular endothelial function in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2002; **160**: 369-76.
155. Insull W Jr, Marquis NR, Tsianco MC. Comparison of the efficacy of Questran Light, a new formulation of cholestyramine powder, to regular Questran in maintaining lowered plasma cholesterol levels. *Am J Cardiol*. 1991; **67**: 501-5.
 156. Isusi E, Aspichueta P, Liza M, Hernandez ML, Diaz C, Hernandez G, et al. Short- and long-term effects of atorvastatin, lovastatin and simvastatin on the cellular metabolism of cholesteryl esters and VLDL secretion in rat hepatocytes. *Atherosclerosis*. 2000; **153**: 283-94.
 157. Jeenah M, September W, Graadt van Roggen F, de Villiers W, Seftel H, Marais D. Influence of specific mutations at the LDL-receptor gene locus on the response to simvastatin therapy in Afrikaner patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 1993; **98**: 51-8.
 158. Jeerooburkhan N, Jones LC, Bujac S, Cooper JA, Miller GJ, Vallance P, et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease. *Hypertension*. 2001; **38**: 1054-61.
 159. Jensen LG, Jensen HK, Heath F, Eiberg H, Kjeldsen M, Færgeman O, et al. Allele-specific measurement of low-density lipoprotein receptor transcript levels. *Hum Mutat*. 1996a; **8**: 26-33.
 160. Jensen LG, Jensen HK, Nissen H, Kristiansen K, Færgeman O, Bolund L, et al. An LDL receptor promoter mutation in a heterozygous FH patient with dramatically skewed ratio between the two allelic mRNA variants. *Hum Mutat*. 1996b; **7**: 82-4.
 161. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle J, et al. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clin Chem*. 1999; **45**: 1113-40.
 162. Juhan-Vague I, Alessi MC. Plasminogen activator inhibitor 1 and atherothrombosis. *Thromb Haemost*. 1993; **70**: 138-43.
 163. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in

- patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation*. 1996; **94**: 2057-63.
164. Kajinami K, Yagi K, Higashikata T, Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Low-density lipoprotein receptor genotype-dependent response to cholesterol lowering by combined pravastatin and cholestyramine in familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* .1998; **82**: 113-7.
 165. Kalina A, Csaszar A, Czeizel AE, Romics L, Szaboki F, Szalai C, et al. Frequency of the R3500Q mutation of the apolipoprotein B-100 gene in a sample screened clinically for familial hypercholesterolemia in Hungary. *Atherosclerosis*. 2001; **154**: 247-51.
 166. Kato J, Kitamura K, Matsui E, Tanaka M, Ishizaka Y, Kita T et al. Plasma adrenomedullinand natriuretic peptides in patients with essential or malignant hypertension. *Hypertens Res*. 1999; **22**: 61-5.
 167. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, Yazaki Y. Genetic analysis of the atrial natriuretic peptide gene in essential hypertension. *Clinical Science*. 2000; **98**: 251-8.
 168. Kato N, Ikeda K, Nabika T, Morita H, Sugiyama T, Gotoda T et al. Evaluation of the atrial natriuretic peptide gene in stroke. *Atherosclerosis*. 2002; **163**: 279-86.
 169. Kauma H, Savolainen MJ, Rantala AO, Lilja M, Kervinen K, Reunanen A, et al. Apolipoprotein E phenotype determines the effect of alcohol on blood pressure in middle-aged men. *Am J Hypertens*. 1998; **11**: 1334-43.
 170. Ketomaki A, Gyllingt H, Siimes MA, Vuorio A, Miettinen TA. Squalene and noncholesterol sterols in serum and lipoproteins of children with familial hypercholesterolemia. *Pediatr Res*. 1995; **36**: 1807-12.
 171. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *Am J Med*. 1964; 37: 402-7.
 172. Khachadurian AK, Uthman SM. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab*. 1973; **15**: 132-40.

173. Knipscheer HC, Boelen CC, Kastelein JJ, van Diermen DE, Groenemeijer BE, van den Ende A, et al. Short-term efficacy and safety of pravastatin in 72 children with familial hypercholesterolemia. *Pediatr Res*. 1996; **39**: 867-71.
174. Koizumi J, Haraki T, Yagi K, Inazu A, Kajinami K, Miyamoto S, et al. Clinical efficacy of fluvastatin in the long-term treatment of familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 1995; **76**: 47-50A.
175. Koivisto UM, Palvimo JJ, Janne OA, Kontula K. A single-base substitution in the proximal Sp1 site of the human low-density lipoprotein receptor promoter as a cause of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; **91**: 10526-30.
176. Koller E, Koller F, Binder BR. Purification and identification of the lipoprotein-binding proteins from human blood platelet membrane. *J Biol Chem*. 1989; **264**: 12412-18.
177. Kotze MJ, De Villiers WJ, Steyn K, Kriek JA, Marais AD, Langenhoven E, et al. Phenotypic variation among familial hypercholesterolemics heterozygous for either one of two Afrikaner founder LDL receptor mutations. *Arterioscler Thromb*. 1993; **13**: 1460-8.
178. Kovanen PT, Basu SK, Goldstein JL, Brown MS. Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue. *Endocrinology*. 1979; **104**: 610-6.
179. Kragelund C, Gronning B, Kober L, Hildebrandt P, Steffensen R. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2005; **352**: 666-75.
180. Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval CM, Binkoski AE, Hilpert KF, et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med*. 2002; **113**: 71-88S.
181. Kwiterovich PO Jr, Fredrickson DS, Levy RI. Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic and clinical presentation in childhood. *J Clin Invest*. 1974; **53**: 1237-49.

182. Lam TH, Liu LJ, Janus ED, Bourke C, Hedley AJ. The relationship between fibrinogen and other coronary heart disease risk factors in a Chinese population. *Atherosclerosis*. 1999; **143**: 405-13.
183. Lambert M, Assouline L, Feoli-Fonseca JC, Brun N, Delvin EE, Levy E. Determinants of lipid level variability in French-Canadian children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; **21**: 979-84
184. Langer T, Strober W, Levy RI. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1972 ; **51**: 1528-36.
185. Lehrman MA, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW, Schneider WJ. Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain. *Cell*. 1985 ; **41**: 735-43.
186. Leitersdorf E, Hobbs HH, Fourie AM, Jacobs M, van der Westhuyzen DR, Coetzee GA. Deletion in the first cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor impairs its transport but not lipoprotein binding in fibroblasts from a subject with familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; **85**: 7912-6.
187. Leitersdorf E, Van der Westhuyzen DR, Coetzee GA, Hobbs HH. Two common low density lipoprotein receptor gene mutations cause familial hypercholesterolemia in Afrikaners. *J Clin Invest*. 1989; **84**: 954-61.
188. Leitersdorf E, Eisenberg S, Eliav O, Friedlander Y, Berkman N, Dann EJ, et al. Genetic determinants of responsiveness to the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin in patients with molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1993; **87**: III35-44.
189. Leren TP, Hjermann I. Is responsiveness to lovastatin in familial hypercholesterolaemia heterozygotes influenced by the specific mutation in the low-density lipoprotein receptor gene? *Eur J Clin Invest*. 1995; **25**: 967-73.
190. Leren TP, Tonstad S, Gundersen KE, Bakken KS, Rodningen OK, Sundvold H, et al. Molecular genetics of familial hypercholesterolemia in Norway. *J Intern Med*. 1997; **241**: 185-94.

191. Leren TP. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2004a; **65**: 419-22.
192. Leren TP, Manshaus T, Skovholt U, et al. Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. *Semin Vasc Med*. 2004b; **4**: 75-85.
193. Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis*. 2001; **154**: 641-9.
194. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic Peptides. *New Engl J Med*. 1998; 339: 321-8.
195. Lind S, Olsson AG, Eriksson M, Rudling M, Eggertsen G, Angelin B. Autosomal recessive hypercholesterolaemia: normalization of plasma LDL cholesterol by ezetimibe in combination with statin treatment. *J Intern Med*. 2004; **256**: 406-12.
196. Ling WH, Jones PJ. Dietary phytosterol: a review on metabolism benefits, and side effects. *Life Sci*. 1995; **57**: 195-206
197. Loktionov A. Common gene polymorphisms *and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases*. *J Nutr Biochem*. 2003; **14**: 426-51.
198. Lombardi MP, Redeker EJ, Defesche JC, Kamerling SW, Trip MD, Mannens MM, et al. Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in the Netherlands. *Clin Genet*. 2000; **57**: 116-124.
199. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995; **38**: 87-104.
200. Ludwig EH, Hopkins PN, Allen A, Wu LL, Williams RR, Anderson JL, et al. Association of genetic variations in apolipoprotein B with hypercholesterolemia, coronary artery disease, and receptor binding of low density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1997; **38**: 1361-73.

201. Luc G, Bard J, Arveiler D, Evans A, Cambou J, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets J, Cambien F, Fruchart J, Ducimetiere P. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction: the ECTIM Study. *Arterioscler Thromb*. 1994; **14**: 1412-9.
202. Luskey KL, Faust JR, Chin DJ, Brown MS, Goldstein JL. Amplification of the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, but not for the 53-protein, in UT-1 cells. *J Biol Chem*. 1983; **258**: 8462-9.
203. Mabuchi H, Haba T, Ueda K, Ueda R, Tatami R, Ito S, et al. Serum lipids and coronary heart disease in heterozygous familial hypercholesterolemia in the Hokuriku District of Japan. *Atherosclerosis*. 1977; **28**: 417-23.
204. Maciejko JJ, Holmes DR, Kottken BA, Zinsmeister AR, Dinh DM, Mao JT. Apolipoprotein A-I as a marker of angiographically assessed coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1983; **309**: 385-9.
205. Mahley RW, Rall SC. Type III hyperlipoproteinemia (Dysbetalipoproteinemia). The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. . In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vall D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th edition. New York: Mc Graw Hill. Chapter 119.
206. Maioli E, Torricelli C, Santucci A, Martelli P, Pacini A. Plasma factors controlling atrial natriuretic peptide (ANP) aggregation: role of lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 2001; **1536**: 123-32.
207. Marais AD, Firth JC, Bateman ME, Byrnes P, Martens C, Mountney J. Atorvastatin: an effective lipid-modifying agent in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; **17**: 1527-31.
208. Marang-van de Mheen PJ, ten Absroek AH, Bonneux L, Bonsel GJ, Klazinga NS. Cost effectiveness of family DNA based screening programme on familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Eur Heart J*. 2002; **23**: 1922-30.
209. Marks D, Wonderling D, Thorogood M, Lambert H, Humphries SE, Neil HA. Cost effectiveness analysis of different approaches of screening for familial hypercholesterolemia. *BMJ*. 2002; **324**: 1303-8.
210. Mavroidis N, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Drogari E, Matsaniotis N, Humphries SE, et al. A high incidence of mutations in exon 6 of the low-density

- lipoprotein receptor gene in Greek familial hypercholesterolemia patients, including a novel mutation. *Hum Mutat.* 1997; **9**: 274-6.
211. Maxfield FR. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol.* 1982; **95**: 676-81.
 212. Miettinen TA, Gylling H, Lindholm N, Miettinen TE, Rajaratnam RA, Relas H. Serum noncholesterol sterols during inhibition of cholesterol synthesis by statins. *J Lab Clin Med.* 2003; **141**: 131-7.
 213. Miller, SA, Dykes, DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; **16**: 1215.
 214. Miltiادous G, Elisaf M, Xenophontos S, Manoli P, Cariolou MA. Segregation of a novel LDLR gene mutation (I430T) with familial hypercholesterolaemia in a Greek pedigree. *Hum Mutat.* 2000; **16**: 277.
 215. Miltiادous G, Elisaf M, Bairaktari H, Xenophontos SL, Manoli P, Cariolou MA. Characterization and geographic distribution of the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene mutations in northwestern Greece. *Hum Mutat.* 2001; **17**: 432-3.
 216. Miserez AR, Muller PY. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation emerged in the mesolithic ancestors of Celtic peoples? *Atherosclerosis.* 2000; **148**: 433-6
 217. Miserez AR, Laager R, Chiodetti N, Keller U. High prevalence of familial defective apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J Lipid Res.* 1994; **35**: 574-83.
 218. Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ. Human PON₂ gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998; **213**: 149-57.
 219. Mohrschladt MF, van der Sman-de Beer F, Hofman MK, van der Krabben M, Westendorp RG, Smelt. TaqIB polymorphism in CETP gene: the influence on incidence of cardiovascular disease in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet.* 2005; **13**: 877-82.

220. Moorjani S, Roy M, Gagne C, Davignon J, Brun D, Toussaint M, et al. Homozygous familial hypercholesterolemia among French Canadians in Quebec Province. *Arteriosclerosis*. 1989; **9**: 211-16.
221. Moorjani S, Roy M, Torres A, Bétard C, Gagné C, Lambert M, et al. Mutations of low density lipoprotein receptor gene, variation in plasma cholesterol, and expression of coronary heart disease in homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet*. 1993; **341**: 1303-6.
222. Mozas P, Cenarro A, Civeira F, Castillo S, Ros E, Pocovi M. Mutation analysis in 36 unrelated Spanish subjects with familial hypercholesterolemia: identification of 3 novel mutations in the LDL receptor gene. *Hum Mutat*. 2000; **15**: 483-4.
223. Mozas P, Galetto R, Albajar M, Ros E, Pocovi M, Rodriguez-Rey JC. A mutation (-49C>T) in the promoter of the low-density lipoprotein receptor gene associated with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*. 2002; **43**: 13-8.
224. Mozas P, Castillo S, Reyes G, Tejedor D, Civeira F, Garcia-Alvarez I, et al. Apolipoprotein E genotype is not associated with cardiovascular disease in heterozygous subjects with familial hypercholesterolemia. *Am Heart J*. 2003; **145**: 999-1005.
225. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999; **99**: 2864-70.
226. Nannipieri M, Manganiello M, Pezzatini A, De Bellis A, Seghieri G, Ferrannini E. Polymorphisms in the hANP (human atrial natriuretic peptide) gene, albuminuria, and hypertension. *Hypertension*. 2001; **37**: 1416-22.
227. Nauck MS, Koster W, Dorfer K, Eckes J, Scharnagl H, Gierens H, et al. Identification of recurrent and novel mutations in the LDL receptor gene in German patients with familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*. 2001; **18**: 165-6.
228. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R, Hokanson JE, et al. Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; **16**: 1243-9.

229. Newson AJ, Humphries SE. Cascade genetic testing in familial hypercholesterolemia: how should family members be contacted? *Eur J Hum Genet.* 2005; **13**: 401-8.
230. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, et al. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 44444-9.
231. Nissen H, Guldberg P, Hansen AB, Petersen NE, Horder M. Clinically applicable mutation screening in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1996; **8**: 168-77.
232. Πίτσαβος ΧΗ, Παναγιωτάκος ΔΒ, Στεφανάδης ΧΙ. Η επιδημιολογία της στεφανιαίας νόσου στην Ελλάδα. Οξεία στεφανιαία σύνδρομα. Εκδόσεις Κωστάκη. 2004.
233. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Applied Physic.* 1953; **24**: 1424.
234. Pallaud C, Gueguen R, Sass C, Grow M, Cheng S, Siest G, et al. Genetic influences on lipid metabolism trait variability within the Stanislas Cohort. *J Lipid Res.* 2001; **42**: 1879-90.
235. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Chrysoshoou C, Toutouza M, Stefanadis CI, Toutouzas PK. Importance of LDL/HDL cholesterol ratio as a predictor for coronary heart disease events in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia: a 15-year follow-up (1987–2002). *Curr Med Res Op.* 2003; **19**: 89-94.
236. Paschos GK, Yiannakouris N, Rallidis LS, Davies I, Griffin BA, Panagiotakos DB, et al. Apolipoprotein E genotype in dyslipidemic patients and response of blood lipids and inflammatory markers to alpha-linolenic Acid. *Angiology.* 2005; **51**: 41-60.
237. Pastan MS, Willingham MC. Receptor-mediated endocytosis: coated pits receptosomes and the Golgi. *Trends Biochem Sci.* 1983; **8**: 250-4.
238. Patterson D, Slack J. Lipid abnormalities in male and female survivors of myocardial infarction and their first-degree relatives. *Lancet.* 1972; **1**: 393–9.

239. Pechham CS, Dezateux C. Issues underlying the evaluation of screening programmes. *Br Med Bull*. 1998; **54**: 767-78.
240. Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Mata P. Protective effect of dietary monosaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis*. 2002; **163**: 385-98.
241. Pimstone SN, Defesche JC, Clee SM, Bakker HD, Hayden MR, Kastelein JJ. Differences in the phenotype between children with apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1997; **17**: 826-33.
242. Pimstone SN, Sun X-M, du Souich C, Frohlich JJ, Hayden MR, Soutar AK. Phenotypic variation in heterozygous familial hypercholesterolemia: a comparison of Chinese patients with the same or similar mutations in the LDL receptor gene in China or Canada. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; **18**: 309-15.
243. Pisciotta L, Cortese C, Gnasso A, Liberatoscioli L, Pastore A, Mannucci L, Irace C, Federici G, Bertolini S. Serum homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2005; **179**: 333-8.
244. Pitsavos C, Choumerianou DM, Skoumas J, Maumus S, Stefanadis CS, Dedoussis GVZ, Visvikis-Siest S. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with lipid levels and coronary artery disease in Greek patients with Familial Hypercholesterolemia. *Clinical and Experimental Medicine*. 2005; **5**: 196-201.
245. Pittman RC, Carew TE, Attie AD, Witztum JL, Watanabe Y, Steinberg D. Receptor-dependent and receptor-independent degradation of low density lipoprotein in normal rabbits and in receptor-deficient mutant rabbits. *J Biol Chem*. 1982; **257**: 7994-8000.
246. Postglione A, Thomson GR. Experience with plasma-exchange in homozygous familial hypercholesterolemia. *Prog Clin Biol Res*. 1985; **188**: 213-20.
247. Pravastatin Multicenter Study Group II. Comparative efficacy and safety of pravastatin and cholestyramine alone and combined in patients with hypercholesterolemia. *Arch Intern Med*. 1993; **153**: 1321-9.

248. Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Stafforini DM. Sol Sherry lecture in thrombosis. Molecular events in acute inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; **22**: 727-33.
249. Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase /aryesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996; **33**: 498-509.
250. Pullinger CR, Hennessey LK, Chatterton JE, Liu W, Love JA, Mendel CM, et al. Familial ligand-apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDLreceptor binding affinity. *J Clin. Invest.* 1995; **95**: 1225-34.
251. Ramasawmy R, Kotea N, Lu CY, Sayada C, Baligadoo S, Krishnamoorthy R. Investigation of the polymorphic Scal site by a PCR-based assay at the human atrial natriuretic peptides (hANP) gene locus. *Hum Genet.* 1992; **90**: 323-4.
252. Report of a WHO consultation: WHO/HGN/CONS/98.7. Familial hypercholesterolemia (FH). 1998.
253. Reilly SL, Ferrell RE, Kottke BA, Kamboh MI, Sing CF. The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of lipids and apolipoproteins in the population of Rochester, MN, I: pleiotropic effects on means and variances. *Am J Hum Genet.* 1991; **49**: 1155-66.
254. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, et al. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* . 2001; **154**: 87-96.
255. Roest M, Jansen AC, Barendrecht A, Leus FR, Kastelein JJ, Voorbij HA. Variation at the paraoxonase gene locus contributes to carotid arterial wall thickness in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem.* 2005; **38**: 123-7.
256. Ross J. Messenger RNA turnover in eukaryotic cells. *Mol Biol Med.* 1988; **5**: 1-14.
257. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 199; **362**: 801-9.

258. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; **340**: 115-26.
259. Rubattu S, Ridker P, Stampfer MJ, Volpe M, Hennekens CH, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. *Circulation*. 1999; **100**: 1722-6.
260. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, Zanda B, Evangelista A, Tarasi D et al.. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. *Stroke*. 2004; **35**: 814-8.
261. Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL. cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; **80**: 7501-5.
262. Russell DW, Schneider WJ, Yamamoto T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell*. 1984; **37**: 577-85.
263. Rutledge D, Sun Y, Ross E. Polymorphisms within the atrial natriuretic peptide gene in essential hypertension. *J Hypertens*. 1995; **13**: 953-5.
264. Saha N, Roy AC, Teo SH, Tay JSH, Ratnam SS. Influence of serum paraoxonase polymorphism on serum lipids and apolipoproteins. *Clin Gen*. 1991; **40**: 277-82.
265. Saint-Jore B, Varret M, Dachet C, Rabes J, Devilliers M, Erlich D, et al, Autosomal dominant type IIA hypercholesterolemia : evaluation of the respective contributions of LDLR and APOB gene defects as well as a third major group of defects. *Eur J Hum Genet*. 2000; **8**: 621-30.
266. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol*. 2000; **152**: 897-907.
267. Sanchez H, Yieh L, Osborne TF. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *Trends Biol Chem*. 1995; **270**: 1161-9.

268. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ*. 1991; **303**: 893-6.
269. Schuster H, Rauch G, Gerl C, Wolfram G, Zollner N. Use of DNA haplotype analysis in diagnosis of familial hypercholesterolemia in 31 German families. *J Med Genet*. 1991; **28**: 865-70.
270. Schmidt HW, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; **88**: 365-9.
271. Seftel HC, Baker SG, Sandler MP, Forman MB, Joffe BI, Mendelsohn D, et al. A host of hypercholesterolaemic homozygotes in South Africa. *BMJ*. 1980; **281**: 633-6.
272. Seftel HC, Baker SG, Jenkins T, Mendelsohn D. Prevalence of familial hypercholesterolemia in Johannesburg Jews. *Am J Med Genet*. 1989; **34**: 545-7.
273. Seidel D. H.E.L.P apheresis therapy in the treatment of severe hypercholesterolemia: 10 years of clinical experience. *Artif Organs*. 1996; **20**: 203-10.
274. Seidman CE, Bloch KD, Klein KA, Smith JA, Seidman JG. 1984. Nucleotide sequences of the human and mouse atrial natriuretic factor genes. *Science*. **226**: 1206-9.
275. Schneider WJ, Slaughter CJ, Goldstein JL, Anderson RG, Capra JD, Brown MS. Use of antipeptide antibodies to demonstrate external orientation of the NH₂-terminus of the low density lipoprotein receptor in the plasma membrane of fibroblasts. *J Cell Biol*. 1983; **97**: 1635-40.
276. Shepherd J. Mechanism of action of bile acid sequestrants and other lipid lowering drugs. *Cardiology*. 1989; **76**: 65-71.
277. Sijbrands EJ, Lombardi MP, Westendorp RG, Leuven JA, Meinders AE, Van der Laarse A, et al. Similar response to simvastatin in patients heterozygous for familial hypercholesterolemia with mRNA negative and mRNA positive mutations. *Atherosclerosis*. 1998; **136**: 247-54.

278. Simons LA, Reichl D, Myant NB, Mancini M. The metabolism of the apoprotein of plasma low density lipoprotein in familial hyperbetalipoproteinaemia in the homozygous form. *Atherosclerosis*. 1975; **21**: 283-98.
279. Simons LA, Nestel PJ, Clifton P, Janus ED, Simons J, Parfitt A. Treatment of primary hypercholesterolaemia with pravastatin: efficacy and safety over three years. *Med J Aust*. 1992; **157**: 584-9.
280. Siperstein MD. Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues. *Curr Topics Cell Reg*. 1970; **2**: 65-100.
281. Slack J. Inheritance of familial hypercholesterolemia. *Atheroscler Rev*. 1979; **5**: 35-66.
282. Slimane MN, Pousse H, Maatoug F, Hammami M, Ben Farhat MH. Phenotypic expression of familial hypercholesterolaemia in central and southern Tunisia. *Atherosclerosis*. 1993; **104**: 153-8.
283. Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*. 1990; **265**: 2306-10.
284. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ, Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; **86**: 587-91.
285. Starzl TE, Bilheimer DW, Bahnson HT, Shaw BW Jr, Hardesty RL, Griffith BP, et al. Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Lancet*. 1984; **1**: 1382-3.
286. Stein EA, Illingworth DR, Kwiterovich PO Jr, Liacouras CA, Siimes MA, Jacobson MS, et al. Efficacy and safety of lovastatin in adolescent males with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1999; **281**: 137-44.
287. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human arteriosclerosis. *Circulation*. **105**: 2002; 2107-11.
288. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. Bios Scientific Publishers. 2nd edn. The Bath Press. 2000.

289. Stuyt PMJ, Brenninkmeijer BJ, Damacker PNM, Hendriks JCM, van Elteren P, Stalenhoef AFH, van't Laar A. Apolipoprotein E phenotypes, serum lipoproteins and apolipoproteins in angiographically assessed coronary heart disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 1991; **51**: 425-35.
290. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 1985; **228**: 815-22.
291. Südhoff TC, Van Der Westhuyzen DR, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*. 1987; **262**: 10773-9.
292. Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S, et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation*. 2002; **106**: 1943-8.
293. Sugano M, Morioka H, Ikeda I. A comparison of hypercholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. *J Nutr*. 1977; **107**: 2011-9.
294. Sugiyama N, Marcovina S, Gown AM, Seftel H, Joffe B, Chait A. Immunohistochemical distribution of lipoprotein epitopes in xanthomata from patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Pathol*. 1992; **141**: 99-106.
295. Sumi D, Hayashi T, Thankur NK, Jayachandran M, Asai Y, Kano H, et al. A HMG-CoA reductase inhibitor possesses a potent anti-atherosclerotic effect other than serum lipid lowering effects—the relevance of endothelial nitric oxide synthase and superoxide anion scavenging action. *Atherosclerosis*. 2001; **155**: 347-57.
296. Sun XM, Webb JC, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Thompson GR, et al. Characterisation of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the United Kingdom. *Arterioscl Thromb*. 1992; **12**: 762-70.
297. Sun XM, Neuwirth C, Wade DP, Knight BL, Soutar AK. A mutation T-45C in the promoter region of the low density-lipoprotein (LDL-receptor gene) is associated with a mild clinical phenotype in a patient with heterozygous familial hypercholesterolaemia (FH). *Hum Mol Genet*. 1995; **4**: 2125-9.

298. Sun XM, Patel DD, Knight BL, Soutar AK. Influence of genotype at the low density lipoprotein (LDL) receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid-lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolaemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Atherosclerosis*. 1998; **136**: 175-85.
299. Tabas I. Cholesterol in health and disease. *J Clin Invest*. 2002; 110: 583-90.
300. Takahashi M, Hoshii Y, Kawano H, Gondo T, Yokota T, Okabayashi H, et al. Ultrastructural evidence for the formation of amyloid fibrils within cardiomyocytes in isolated atrial amyloid. *Amyloid*. 1998; **5**: 35-42.
301. Tang K, Fu DJ, Julien D, Braun A, Cantor cr, Koster H. Chip based genotyping by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 10016-20.
302. Taskinen MR, Nikkila EA, Valimaki M, Sane T, Kuusi T, Kesaniemi A, Ylikahri T. Alcohol-induced changes in serum lipoproteins and in their metabolism. *Am Heart J*. 1987; **113**: 458-63.
303. Thomson GR, Lowenthal R, Myant NB. Plasma exchange in the management of homozygous familial hypercholesterolemia. *Lancet*. 1975; **I**: 1208-11.
304. Thomson GR, Miller JP, Breslow JL. Improved survival of patients with homozygous FH treated with plasma exchange. *Brit Med J*. 1985; **291**: 1671-73.
305. Thompson GR, Seed M, Niththyananthan S, McCarthy S & Thorogood M. Genotypic and phenotypic variation in familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis*. 1989; **9**: I-75-I-80.
306. Timms KM, Wagner S, Samuels ME, Forbey K, Goldfine H, Jammulapati S, et al. A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet*. 2004; **114**: 349-53.
307. Tiret L, de Knijff P, Menzel HJ, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS Study. European Atherosclerosis Research Study. *Arterioscler Thromb*. 1994a; **14**: 1617-24.

308. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Richard S, Marques-Vidal P, Evans A, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphisms on risk of myocardial infraction. *Lancet*. 1994; 344: 910-3.
309. Tolleshaug H, Goldstein JL, Schneider WJ, Brown MS. Posttranslational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia. *Cell*. 1982; **30**: 715-24.
310. Tonstad S, Vollebaek LE, Ose L. Screening for familial hypercholesterolemia in relatives. *Lancet*. 1995; **346**: 1438.
311. Tonstad S. Familial hypercholesterolemia: a pilot study of patients' and children's concerns. *Acta Paediatr*. 1996; **85**: 1307-13.
312. Tonstad S, Nøvik TS, Vandvik IH. Psychosocial function during treatment for familial hypercholesterolemia. *Pediatrics*. 1996; **98**: 249-55.
313. Traeger-Synodinos J, Mavroidis N, Kanavakis E, Drogari E, Humphries SE, Day IN, et al. Analysis of low density lipoprotein receptor gene mutations and microsatellite haplotypes in Greek FH heterozygous children: six independent ancestors account for 60% of probands. *Hum Genet*. 1998; 102(3): 343-7.
314. Tybjaerg-Hansen A, Humphries SE. Familial defective apolipoprotein B-100: a single mutation that causes hypercholesterolemia and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1992; **96**: 91-107.
315. Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*. 1998; **338**: 1577-84.
316. Umans-Eckenhuis MAW, Defesche JC, Sijbrands EJG, et al. Review of the first 5 years of screening for familial hypercholesterolemia in The Netherlands. *Lancet*. 2001a; **357**: 165-8.
317. Umans-Eckenhuis MA, Oort FJ, Ferenschild KC, Defesche JC, Kastelein JJ, de Haes JC. Parental attitude towards genetic testing for familial hypercholesterolemia in children. *J Med Genet*. 2002b; **39**: e49.

318. Umans-Eckenhausen MA, Sijbrands EJ, Kastelein JJ, Defesche JC. Low-density lipoprotein receptor gene mutations and cardiovascular risk in a large genetic cascade screening population. *Circulation*. 2002; **106**: 3031-6.
319. Umans-Eckenhausen MA, Defesche JC, van Dam MJ, Kastelein JJ. Long-term compliance with lipid-lowering medication after genetic screening for familial hypercholesterolemia. *Arch Int Med*. 2003; **163**: 65-8.
320. van Gaal LF, Peeters AV, De Block CEM, de Leeuw IH, Thiart R, Kotze MJ. Low-density lipoprotein receptor gene mutation analysis and clinical correlation in Belgian hypercholesterolemics. *Mol Cell Probes*. 2001; **15**: 329-36.
321. van Maarle MC, Stouthard ME, Marang-van de Mheen PJ, Klazinga NS, Bonsel GJ. How disturbing is it to be approached for a genetic screening programme for familial hypercholesterolaemia. *Community Genet*. 2001; **4**: 244-52.
322. van Maarle MC, Stouthard MEA, Bonsel GJ. Quality of life in a family based cascade screening programme for familial hypercholesterolemia: a longitudinal study among participants. *J Med Genet*. 2003; **40**: e3.
323. van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A, Iliadou A, Eriksson P, Hamsten A. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the β -fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1989; **19**: 3063-70.
324. Varret M, Rabes JP, Saint-Jore B. A third locus for autosomal dominant hypercholesterolemia maps to 1p34.1-p32. *Am J Hum Genet*. 1999; **64**: 1378-87.
325. Vega GL, Grundy SM. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. 1986; **78**: 1410-4.
326. Vergopoulos A, Bajari T, Jouma M, Knoblauch H, Aydin A, Bahring S, Mueller-Myhsok B, Dresel A, Joubran R, Luft FC, Schuster H. A xanthomatosis-susceptibility gene may exist in a Syrian family with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet*. 1997; **5**: 315-23.

327. Vermeer BJ, Mateysen AA, Van Gent CM, Van Sabben RM, Emeis JJ. The lipid composition and localisation of free and esterified cholesterol in different types of xanthomas. *J Clin Dermatol*. 1982; **78**: 305-8.
328. Vohl MC, Gaudet D, Moorjani S, Tremblay G, Perron P, Gagne C, et al. Comparison of the effect of two low-density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest*. 1997; **27**: 366-73.
329. Vohl MC, Szots F, Lelievre M, Lupien PJ, Bergeron J, Gagne C, et al. Influence of LDL receptor gene mutation and apo E polymorphism on lipoprotein response to simvastatin treatment among adolescents with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2002; **160**: 361-8.
330. Vuorio AF, Ojala JP, Sarna S, Turtola H, Tikkanen MJ, Kontula K. Heterozygous familial hypercholesterolaemia: the influence of the mutation type of the low-density-lipoprotein receptor gene and PvuII polymorphism of the normal allele on serum lipid levels and response to lovastatin treatment. *J Intern Med*. 1995; **237**: 43-8.
331. Vuorio AF, Turtola H, Piilahti KM, Repo P, Kanninen T, Kontula K. Familial hypercholesterolemia in the Finnish north Karelia. A molecular, clinical, and genealogical study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; **17**: 3127-38.
332. Vuorio AF, Aalto-Setälä K, Koivisto UM, Turtola H, Nissen H, Kovanen PT, et al. Familial hypercholesterolaemia in Finland: common, rare and mild mutations of the LDL receptor and their clinical consequences. Finnish FH-group. *Ann Med*. 2001; **33**: 410-21.
333. Wang X, GreilBerger J, Ratscheck M, Jurgens G. Oxidative modification of LDL increase its binding to extracellular matrix from human aortic intima: influence of lesion development, lipoprotein lipase and calcium. *J Pathol*. 2001; **195**: 244-50.
334. Webb JC, Patel DD, Shoulders CC, Knight BL, Soutar AK. Genetic variation at a splicing branch point in intron 9 of the low density lipoprotein (LDL)-receptor gene: a rare mutation that disrupts mRNA splicing in a patient with familial hypercholesterolemia and a common polymorphism. *Hum Mol Genet*. 1996; **5**: 1325-31.

335. Wiegman A, Sijbrands EJ, Rodenburg J, Defesche JC, de Jongh S, Bakker HD, et al. The apolipoprotein epsilon4 allele confers additional risk in children with familial hypercholesterolemia. *Pediatr Res*. 2003; **53**: 1008-12.
336. Wierzbicki AS, Lumb PJ, Chik G, Crook MA. Comparison of therapy with simvastatin 80 mg and atorvastatin 80 mg in patients with familial hypercholesterolaemia. *Int J Clin Pract*. 1999; **53**: 609-11.
337. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol*. 1993; **72**:171-6.
338. Wilcken DE. Overview of inherited metabolic disorders causing cardiovascular disease. *J Inherit Metab Dis*. 2003; **26**: 245-57.
339. Williams RR, Hamilton-Craig I, Kostner GM, et al. MED PED: An integrated genetic strategy for preventing early deaths. In: Genetic approaches to noncommunicable diseases (Berg K, Boulyjenkov V, Christen Y, eds). Berlin: Springer Verlag, 1996; 35-46.
340. Wilson JMG, Jungner G. Principles and practice for screening of disease. Geneva: WHO, 1968.
341. Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA*. 1994; **272**: 1666-71.
342. Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; **16**: 1250-5.
343. Wittekoek ME, Pimstone SN, Reymer PW, Feuth L, Botma GJ, Defesche JC, et al. A common mutation in the lipoprotein lipase gene (N291S) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998; **97**: 729-35.
344. Wittekoek ME, Moll E, Pimstone SN, Trip MD, Lansberg PJ, Defesche JC, et al. A frequent mutation in the lipoprotein lipase gene (D9N) deteriorates the biochemical and clinical phenotype of familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; **19**: 2708-13.

345. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation*. 1999; **99**: 2901-7.
346. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*. 1991; **88**: 1785-92.
347. Witztum JL. To E or not to E—how do we tell. *Circulation*. 1998; **50**: 2785-7.
348. Wonderling D, Umans-Eckenhausen MA, Marks D, Defesche JC, Kastelein JJ, Thorogood M. Cost-effectiveness analysis of the genetic screening program for familial hypercholesterolemia in the Netherlands. *Sem Vasc Med*. 2004; **4**: 97-104.
349. Wood D, De Backer G, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Pyorala K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendation of the second task force of European and other societies on coronary prevention. *Atherosclerosis*. 1998; **140**: 199-270.
350. Xenophontos SL, Pierides A, Demetriou K, Avraamides P, Manoli P, Ayrton N, et al. Geographical clustering of low density lipoprotein receptor gene mutations (C292X; Q363X; D365E & C660X) in Cyprus. *Hum Mutat*. 2000; **15**: 380-4.
351. Yamada N, Shimano H, Mokuno H, Ishibashi S, Gotohda T, Kawakami M, et al. Increased clearance of plasma cholesterol after injection of apolipoprotein E into Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; **86**: 665-9.
352. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell*. 1984; **39**: 27-38.
353. Yamamoto A, Harada-Shiba M, Endo M, Kusakabe N, Tanioka T, Kato H, et al. The effect of ezetimibe in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy. *Atherosclerosis*. 2005; In Press.
354. Yu W, Atsushi N, Higashikata T, Lu H, Akihiro I, Mabuchi H. Molecular genetic analysis of familial hypercholesterolemia: spectrum and regional difference of

- LDL receptor gene mutations in Japanese population. *Atherosclerosis*. 2002; **165**: 335-42.
355. Xenophontos SL, Pierides A, Demetriou K, Avramides P, Manoli P, Ayrton N, et al. Geographical clustering of low density lipoprotein receptor gene mutations (C292X; Q363X; D365E & C660X) in Cyprus. *Hum Mutat*. 2000; **15**: 380.
356. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000; **149**: 251-66.

ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

www.ucl.ac.uk/fh.3

www.umd.necker.fr

<http://www.HGVs.org/mutnomen>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα 1. Κανονισμοί που τέθηκαν το 1968 από τον WHO για την εφαρμογή γενετικής ανάλυσης.

- 1) Αποτελεί η ασθένεια ένα σοβαρό πρόβλημα υγείας;
- 2) Υπάρχει ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό κατά το στάδιο εμφάνισης συμπτωμάτων;
- 3) Γνωρίζουμε τη φυσιολογική αιτιολογία της νόσου;
- 4) Υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για τους ασθενείς που γίνεται γενετική διάγνωση;
- 5) Υπάρχει μια εξέταση που μπορεί να διαγνώσει την ασθένεια σε αρχικό στάδιο;
- 6) Είναι αποδεκτή η εξέταση στον πληθυσμό;
- 7) Υπάρχει συμφωνία σχετικά με το ποιος είναι υπεύθυνος για την εφαρμογή της θεραπείας;
- 8) Υπάρχει διαθέσιμος εξοπλισμός για την διάγνωση και θεραπεία;
- 9) Η εύρεση περιπτώσεων δεικτών πρέπει να είναι συνεχιζόμενη.

Το κόστος της εύρεσης ασθενών (συμπεριλαμβανομένων της διάγνωσης και της θεραπείας) πρέπει να είναι σε ισορροπία με τα έξοδα που θα χρειάζονταν για ιατρική νοσηλεία.

Παράρτημα 2. Έγκριση Επιτροπής Βιοηθικής.

Παράρτημα 3. Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής.

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΕΓΩ,Ο/Η _____
ΚΑΤΟΙΚΟΣ _____
Τηλ _____

ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΕΓΓΡΑΦΟ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΩ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΠΟΙΩ ΤΑ ΑΚΟΛΟΥΘΑ:

Με το παρόν έγγραφο δηλώνω την εθελοντική συμμετοχή μου στην ερευνητική μελέτη με τίτλο «Ανίχνευση μεταλλάξεων και μελέτη του ρόλου γνωστών πολυμορφισμών γονιδίων στην οικογενή υπερχοληστερολαιμία- Συσχέτιση μεταλλάξεων με ανταπόκριση σε θεραπεία με στατίνη.»

Επιστημονικός υπεύθυνος του προγράμματος είναι ο Επίκουρος καθηγητής.
Γιώργος Δεδούσης.

Οι μετρήσεις στις οποίες θα συμμετάσχουν οι εθελοντές είναι οι ακόλουθες:

- Λήψη 3 ml αίματος από κάθε συμμετέχοντα ανά 3 μήνες.
- Συμπλήρωση σύντομου ερωτηματολογίου που θα περιλαμβάνει:
 - Δημογραφικά στοιχεία (όνομα, ηλικία, φύλο).
 - Κατάσταση υγείας (ιατρικό ιστορικό).
 - Διατροφική πρόσληψη – συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων.
 - Καπνιστικές συνήθειες και κατανάλωση αλκοόλ.
 - Φυσική δραστηριότητα.
 - Μέτρηση ανθρωπομετρικών παραμέτρων (βάρος, ύψος).

ΣΥΝΟΨΗ

Κατά την άποψή μου έχω λάβει επαρκή ενημέρωση για: α) τη φύση, τη διάρκεια και το σκοπό της μελέτης, β) τα μέσα με τα οποία θα διεξαχθεί η μελέτη.

Εξουσιοδοτώ το Εργαστήριο Βιολογίας, του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου να αναλύσει τα προσωπικά μου στοιχεία. Η κάτωθι υπογραφή μου αποτελεί επιβεβαίωση της επαρκούς ενημέρωσής μου για τις αρχές και τα πλεονεκτήματα του προγράμματος

Κατανοώ τα παρακάτω, που αφορούν τη διαδικασία και τα αποτελέσματα της ανάλυσης:

1. Τα αποτελέσματα των γενετικών αναλύσεων που θα προκύψουν αφορούν την συσχέτιση της γενετικής προδιάθεσης με την οικογενή υπερχοληστερολαιμία.
2. Από τη συσχέτιση των γενετικών δεικτών με τη θεραπεία θα εκτιμηθεί η ανταπόκριση σε αυτή.
3. Οποιαδήποτε πληροφορία που αφορά εμένα και τα αποτελέσματα των εξετάσεων, τα οποία θα προκύψουν κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα παραμείνουν **απόρρητα** και δε θα δημοσιευτούν ονομαστικά σε οποιαδήποτε δημοσίευση ή ανακοίνωση προκύψει από τη συγκεκριμένη μελέτη.
4. Εγώ, ο/η υπογραφόμενος/η, κατανοώ τις παραπάνω εξηγήσεις και δίνω τη συναίνεσή μου για την εθελοντική μου συμμετοχή μου στο πρόγραμμα αυτό.
5. Η ηλικία μου είναι ____ ετών. Η ημερομηνία γέννησής μου είναι ____/____/19____.

Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το Συμφωνητικό Συμμετοχής με ελεύθερη βούληση

Το παρόν υπογράφηκε υπό την παρουσία μου

Ο εθελοντής/ Η εθελόντρια

Ο ερευνητής

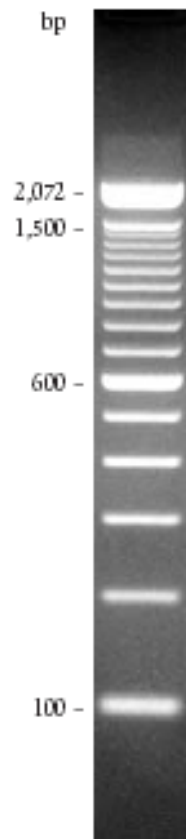
(όνομα και υπογραφή)

(όνομα και υπογραφή)

Παράρτημα 4. Καρτέλα συμπλήρωσης στοιχείων ασθενούς.

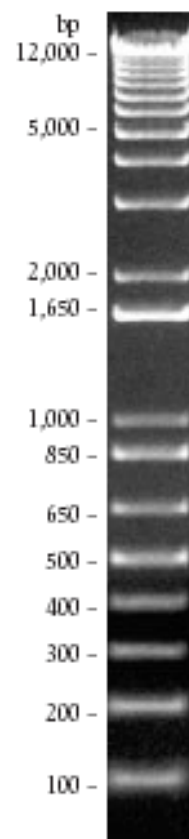
ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ ΦΥΛΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΚΩΔΙΚΟΣ ΗΜ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ CAD ΞΑΝΘΩΜΑΤΑ ΓΕΡΟΝΤΟΤΟΞΟ ΥΠΕΡΤΑΣΗ ΚΑΠΝΙΣΜΑ					
	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
ΒΑΡΟΣ (kg)					
ΥΨΟΣ (m)					
BMI (kg/m ²)					
ΜΕΣΗ/ΓΛΟΥΤΟΙ					
TC mg/dL					
TG mg/dL					
HDL mg/dL					
LDL mg/dL					
Apo-AI mg/dL					
Apo-B mg/dL					
Lp (a) mg/dL					
ΦΑΡΜΑΚΟ mg					

Παράρτημα 5. Μάρτυρες νουκλεϊκών οξέων γνωστού μοριακού μεγέθους.



**100 bp DNA
Ladder**

3 µg/lane;
1.5 % agarose gel stained
with ethidium bromide.



**1 Kb Plus DNA
Ladder**

0.9 µg/lane;
0.9 % agarose gel stained
with ethidium bromide.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Δέσποινα Χουμεριανού

ΒΙΟΛΟΓΟΣ (BSc), ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ (MSc)

Όνομα: **Δέσποινα**

Επίθετο: **Χουμεριανού**

Ημερομηνία Γέννησης: **30/04/1979**

Εθνικότητα: **Ελληνική**

Τόπος Γέννησης: **Ηράκλειο-Κρήτη**

Τηλέφωνο: **(0030) 210 6756123**

(0030) 6936861299

e-mail: **dchoumerianou@hotmail.com**

choumer@hua.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

9/2003- Σήμερα **Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής. Αθήνα.**

Υποψήφια Διδάκτωρ με θέμα "Ανάλυση γενετικού υπόβαθρου σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Συσχέτιση γονότυπου-φαινότυπου".

2001-2002 **University of Glasgow, Πανεπιστήμιο Γλασκόβης.**

Ιατρική Σχολή, Τμήμα Ιατρικής Γενετικής.

Μεταπτυχιακό στην Ιατρική Γενετική (MSc)

**Εργαστηριακή Πτυχιακή Εργασία:* "Μελέτη διαφορικής έκφρασης του γονιδίου FBN1 σε ασθενή με σύνδρομο Μάρφαν."

Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής του νοσοκομείου Yorkhill της Γλασκόβης.

Αναγνώριση μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών από το ΔΙΚΑΤΣΑ 6/2003.

1997-2001 University of Glasgow, Πανεπιστήμιο Γλασκόβης.

Πτυχίο στην Μοριακή και Κυτταρική Βιολογία (BSc with Honors)

*Βεβαίωση παρακολούθησης μαθημάτων **IT** (Τεχνολογίας Πληροφορικής).

**Θεωρητική Πτυχιακή Εργασία:* “HPV και καρκίνος της μήτρας.”

**Εργαστηριακή Πτυχιακή Εργασία:* “Κλωνοποίηση των γονιδίων E8-src-GFP, δημιουργία νέας πρωτεΐνης και εντοπισμός της σε ινοβλάστες με μικροσκόπιο confocal.”

Πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Beatson της Γλασκόβης, για την έρευνα στον καρκίνο.

Αναγνώριση και ισοτιμία τίτλου σπουδών από το ΔΙΚΑΤΣΑ 12/2002.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά Oxford University First Certificate in English

Γαλλικά DELF A1, A2, A3, A4

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής. Αθήνα.

03/2004-Σήμερα Διδάσκων **ΠΔ407/80** για τα μαθήματα “Βιολογία Κυττάρου”, “Μοριακή Βιολογία και Γενετική” και “Γενετική και Διατροφή”

04/2004-09/2005 Συμμετοχή στο πρόγραμμα με τίτλο “Ψευδάργυρος διατροφής, οξειδωτικό stress και ανοσοσγήρανση: βιοχημική, γενετική τρόπος ζωής στην υγιή γήρανση-ZINCAGE”. **6ο Πρόγραμμα Πλαίσιο** της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

- 09/2003-12/2003** Συμμετοχή στο πρόγραμμα **IKY/DA 2001** με τίτλο “Ανάλυση μεταλλαγών στο γονίδιο του υποδοχέα της LDL σε Έλληνες και Γερμανούς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία. Γεωγραφική χαρτογράφηση στην Νότια Ελλάδα και στη Βόρεια Γερμανία”.
- 10/2002-01/2004** Συμμετοχή σε πρόγραμμα **ΠΑΒΕΤ 2000** της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας με τίτλο "Προτύπωση μεθόδων για την ανάλυση καταγραφή & αποθήκευση γενετικών δεικτών σε οικογενείς υπερλιπιδαιμίες".
- 30/11/2003-4/12/2003** **Νοσοκομείο Charite. Βερολίνο. Εργαστήριο Γαστρεντερολογίας Ηπατολογίας και Ενδοκρινολογίας.**
Ανάλυση μεταλλάξεων με ανάγνωση πρωτοδιάταξης DNA (sequencing) στον υποδοχέα LDL σε Γερμανούς και Έλληνες ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία στα πλαίσια του προγράμματος **IKY/DA 2001**.
- 07/2004-08/2004** **Αθήνα 2004.**
Εθελόντρια στη διοργάνωση των Ολυμπιακών αγώνων Αθήνα 2004.
- 07/2001-08/2001** **Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη.**
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας. Εργαστήριο Χ. Σαββάκη.
Πρακτική σε τεχνικές μοριακής βιολογίας.
- 03/1999–04/1999** **Ιατρικό Κέντρο Κρήτης. Εργαστήριο Μικροβιολογίας. Ηράκλειο, Κρήτη.**
Εισαγωγή σε τεχνικές βιοχημικής ανάλυσης.

ΓΝΩΣΕΙΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

Χρήση προγραμμάτων office word, excel, power point. SPSS, MINITAB. Χρήση βάσεων δεδομένων όπως pubmed, athens, bids, edina.

ΤΕΧΝΟΓΝΩΣΙΑ

Τεχνικές μοριακής γενετικής: πλασμιδιακή κλωνοποίηση και χαρτογράφηση με πέψη περιοριστικής ενδονουκλεάσης, PCR, Long PCR και RT-PCR απομόνωση DNA και RNA από διάφορους τύπους ιστών, ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αгарόζης και ακρυλαμίδης (MADGE), Southern Blot, DGGE, ELISA, DNA sequencing, απομόνωση PBMC από αίμα, τροποποίηση λεμφοκυττάρων με ιό Epstein-Bar.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 09/2002** 3^η ετήσια συνάντηση διαδυσκτίου μυϊκής δυστροφίας.
Western Infirmary. Glasgow. UK.
- 03/2003** Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηρωματικής Πλάκας.
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Αθήνα.
- 05/2003** European Human Genetics
ICC. Birmingham. UK.
- 09/2004** Second "Biologie Prospective" Conference.
From human genetic variations to prediction of risks and responses
to the environment. Santorini. Greece.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. **Choumerianou, D.M.**, Dedoussis, G.V.Z., Pitsavos, C., Skoumas, J., Stefanadis, C., Toutouzas, P." Spectrum of mutations of the LDL-R gene in Greek patients with familial hypercholesterolemia." European Conference of Human Genetics May 2003. European Journal of Human Genetics. Vol 11.
2. **Despoina M. Choumerianou**, George V.Z Dedoussis, John Skoumas, Christos Pitsavos, Janine Genschel, Hartmut Schmidt and Christodoulos Stefanadis. "Homogenous Distribution of LDL-R Mutations Causing Familial

Hypercholesterolemia in Greece". 74th European Atherosclerosis Society Congress April 2004. Atherosclerosis Sup. Vol 5.

3. Christina Chrysohoou, George Dedoussis, Demosthenes Panagiotakos, Christos Pitsavos, **Despoina M. Choumerianou**, Antonis Zampelas, "Interaction of MTHFR C677T polymorphism and Mediterranean Diet: effect on homocysteine levels in healthy adults; the ATTICA Study". European Conference of Human Genetics April 2004.
4. George V.Z Dedoussis, Demosthenes Panagiotakos, Christos Pitsavos, Christina Chrysohoou, MD, **Despoina M. Choumerianou**, Christodoulos Stefanadis. "Association of MTHFR C677T polymorphism and inflammatory markers, a risk factor for CHD; the ATTICA Study". European Conference of Human Genetics April 2004.
5. George V.Z Dedoussis, Sandy Maumus, John Skoumas, **Despoina M. Choumerianou**, Christos Pitsavos, Christodoulos Stefanadis, Sophie Visvikis-Siest. "Polymorphism G664A of atrial natriuretic peptide is associated with lipid levels in familial hypercholesterolemia". European Conference of Human Genetics May 2006.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Dedoussis GVZ, Pitsavos C, Kelberman D, Skoumas J, Prassa M, **Choumerianou DM**, Stefanadis C, Humphries SE, Toutouzas P. FH Pyrgos: a novel mutation in the promoter (-45delT) of the low density lipoprotein receptor gene associated with Familial Hypercholesterolemia. Clinical Genetics. 2003; 64 (5): 414-19.
2. Dedoussis GV, Skoumas J, Pitsavos C, **Choumerianou DM**, Genschel J, Schmidt H, Stefanadis C. FH clinical phenotype in Greek patients with defective versus negative mutations. European Journal of Clinical Investigation. 2004; 34 (6): 402-9

3. Dedousis, GVZ, Manios Y, **Choumerianou DM**, Yiannakouris N, Skenderi K, Zampelas A. The G-174C promoter polymorphism of the IL-6 gene in relation to health indices in a cohort of Greek primary school children. *Obesity Research*. 2004; 12 (7): 1037-41.

4. Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Zampelas A, **Choumerianou D**, Stefanadis C. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA Study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80: 849-54.

5. Dedoussis GVZ, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Skoumas J, **Choumerianou D**, Stefanadis C and The ATTICA Study Group. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammation markers related to cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology*. 2005; 100: 409-14.

6. **Choumerianou DM**, Dedoussis GVZ. Familial Hypercholesterolemia and Response to Statin Therapy According to *LDLR* Genetic Background. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2005; 43: 793-891.

7. Pitsavos C, **Choumerianou DM**, Skoumas J, Maumus S, Stefanadis CS, Dedoussis GVZ, Visvikis-Siest S. Apolipoprotein E polymorphism is not associated with lipid levels and coronary artery disease in Greek patients with Familial Hypercholesterolemia. *Clinical and Experimental Medicine*. 2005; 5(4): 196-201.

8. Pitsavos C, Panagiotakos DB, Trichopoulou A, Chrysohoou C, Dedoussis G, Chloptsios Y, **Choumerianou D**, Stefanadis C. The interaction between Mediterranean Diet and Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T mutation on oxidized Low Density Lipoprotein concentrations; the ATTICA Study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular diseases*. 2006; 16: 91-9.

9. Dedoussis GVZ, Maumus S, Skoumas J, **Choumerianou DM**, Pitsavos C, Stefanadis C, Visvikis-Siest S. Natriuretic peptide Val7Met substitution and risk of coronary artery disease in Greek patients with Familial

Hypercholesterolemia. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 2006; 20:1-7.

10. **Choumerianou DM**, Maumus S, Skoumas J, Pitsavos C, Stefanadis C, Visvikis-Siest S, Dedoussis GVZ. Polymorphisms associated with Apolipoprotein B levels in Greek patients with Familial Hypercholesterolemia. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2006; Υπό Δημοσίευση.
11. Kolovou G, Dedoussis GVZ, Anagnostopoulou KK, Hatzigeorgiou G, **Choumerianou DM**, Contoros N, Cokkinos P. Regression of tuberous xanthomas in homozygous familial hypercholesterolemia after LDL apheresis treatment. Journal of Clinical Apheresis. Υπό Δημοσίευση.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ

Ελληνική Εταιρεία Αθηροσκλήρωσης